

Degradation spezifischer mRNA
- Voruntersuchungen zur Eingrenzung des
Todeszeitpunktes

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Stephanie Wiegert, geb. Wehr

geboren am 13. Februar 1982 in Rudolstadt

Gutachter

1. Prof. Dr. med. Gita Mall, Jena
2. Prof. Dr. med. Christian Mawrin, Magdeburg
3. PD Dr. rer. Nat. Dipl.-Biol. Sabine Lutz-Bonengel, Freiburg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.04.2009

Abkürzungsverzeichnis

μ	Mikro (<i>Einheit für 10⁻⁶</i>)
A	Adenin
A	Ampere
APS	Ammoniumperoxidsulfat
Bisacrylamid	N, N'-Methylenbisacrylamid
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
d	Tag
d	desoxy
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleotidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-Na ₂ -Salz
FAM	Fluoreszenzfarbstoff 6-Carboxy-Fluorescein
f	femto (<i>Einheit für 10⁻¹⁵</i>)
g	Gramm
g	Zentrifugalbeschleunigung
G	Guanin
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure
h	Stunde/ Stunden
k	Kilo (<i>Einheit für 10³</i>)
l	Liter
m	Meter
m	milli (<i>Einheit für 10⁻³</i>)
M	Molar (<i>Einheit für 1 mol/l</i>)
Me	Methyl
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure

mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n	nano (<i>Einheit für 10^9</i>)
nt	Nukleotid
p	piko (<i>Einheit für 10^{12}</i>)
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PMI	postmortales Intervall
rfu	relative Fluoreszenzeinheiten
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
s	Sekunden
T	Thymin
t	Zeit
TEMED	1, 2-Bis-(dimethylamino)-ethan (N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin)
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
U	units (internationale Einheiten)
V	Volt
W	Watt

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	III
Inhaltsverzeichnis.....	IV
1 Zusammenfassung.....	VII
2 Einleitung.....	1
2.1 Zweck und Genauigkeit der Todeszeitbestimmung.....	1
2.1.1 Ergänzungen durch das physikalische Modell.....	3
2.1.2 Biochemische Analysen zur Todeszeitbestimmung.....	3
2.1.3 Entomologische Diagnostik.....	4
2.1.4 Molekularbiologische Methoden.....	4
2.2 mRNA und house-keeping Gene.....	6
3 Zielsetzung der Untersuchung.....	7
4 Material und Methoden zur Quantifizierung von mRNA.....	8
4.1 Übereinkünfte zur Vermeidung von Kontamination.....	8
4.2 Herkunft der Proben.....	9
4.3 Besondere Vorsichtsmaßnahmen beim Arbeiten mit RNA.....	9
4.4 Lagerungsbedingungen.....	9
4.5 RNA-Extraktion aus dem Probenmaterial.....	9
4.5.1 Herstellung des Lysates.....	10
4.5.2 Reinigung der RNA.....	10
4.6 RNA-Quantifikation durch spektrophotometrische Analyse.....	11
4.7 RT-PCR der mRNA-Fragmente.....	11
4.7.1 Amplifikation von Interleukin-1-Beta.....	13
4.7.2 Amplifikation von GAPDH.....	14
4.7.3 Amplifikation von Beta-Aktin.....	15
4.8 Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Kontrolle des Amplifikates.....	16
4.9 Silbernitratfärbung der Polyacrylamid-Gele.....	17
4.10 Semiquantitative Fragmentlängenanalyse mittels Kapillar- elektrophorese.....	17
4.11 Quantitative Real-Time-PCR des Beta-Aktin-Fragmentes.....	18
4.11.1 Amplifikationsbedingungen der Real-Time-PCR.....	19
4.11.2 Analyse der Real-Time-PCR-Daten.....	21
4.12 Statistische Analyse.....	21
4.13 Verwendete Materialien.....	21

4.13.1	Chemikalien und Enzyme.....	21
4.13.2	Kits	22
4.13.3	Verbrauchsmaterialien	22
4.13.4	Geräte.....	23
4.13.5	Verwendete Software.....	23
5	Ergebnisse.....	24
5.1	Lagerung des Blutes.....	24
5.2	Semiquantitative und quantitative Analyse.....	24
5.2.1	Fragmentlängenanalyse.....	24
5.2.2	Ergebnisse der Real-Time-PCR	43
5.2.3	Gemeinsame Betrachtung der Ergebnisse von GAPDH, Interleukin-1-Beta und Beta-Aktin	47
5.2.4	Vergleich von PCR und Real-Time-PCR.....	50
6	Diskussion.....	51
6.1	Grundlagen für die Verwendung der gewählten Methoden und Bewertung im Rahmen der Untersuchung.....	51
6.1.1	Methoden der RNA-Extraktion.....	51
6.1.2	Methoden zur Quantifizierung der extrahierten RNA	51
6.1.3	Möglichkeiten der Standardisierung	53
6.1.4	Amplifikationsmethoden und Quantifizierung nach der PCR.....	54
6.2	Diskussion der Ergebnisse im Rahmen der angewandten Methoden	57
6.2.1	Beurteilung der Amplifikationsresultate.....	57
6.2.2	Quantifizierung der Amplifikate	58
6.2.3	Ausblick	62
7	Schlussfolgerungen	65
8	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	66
9	Anhang	73
9.1	Daten	73
9.2	Ehrenwörtliche Erklärung.....	78

1 Zusammenfassung

Die Bestimmung des Todeszeitpunktes beziehungsweise der Leichenliegezeit eines Menschen stellt trotz intensiver Forschung nach wie vor ein Problem rechtsmedizinischer Arbeit dar und sind noch nicht für jeden Zeitraum mit zufrieden stellender Genauigkeit und Sicherheit festzulegen. Die zur Ermittlung des postmortalen Intervalls (PMI) dienenden Methoden beruhen insbesondere auf der Leichenabkühlung, dem Rigor, den Livores, der supravitalen mechanischen Erregbarkeit der Skelettmuskulatur, der elektrischen Erregbarkeit der mimischen Muskulatur sowie der supravitalen Veränderlichkeit der Irisweite durch Pharmaka. Die genannten Techniken werden vor allem zur Schätzung der Leichenliegezeit im frühen postmortalen Intervall eingesetzt. Nach längerfristigen Ansätzen wird noch gesucht.

Bisher gab es wenige Untersuchungen an mRNA in Autopsiefällen, was vorrangig mit der vermuteten geringen Qualität von Ribonukleinsäuren dieses Ursprungs im Zusammenhang stand. Vorhandene Studien beschäftigten sich vor allem mit der Frage, inwieweit auch am postmortalen Gewebe noch diagnostisch gearbeitet werden kann. Spezifische Anwendungen und zeitliche Analysen im Hinblick auf das postmortale Intervall sind noch nicht lange Gegenstand rechtsmedizinischer Forschung. Bis zum jetzigen Zeitpunkt existierende Untersuchungen weisen jedoch auf Zusammenhänge zwischen mRNA-Mengen und der Leichenliegezeit hin.

Die Zielstellung dieser Arbeit lag daher darin, Aussagen zur zeitlichen und quantitativen Nachweisbarkeit sowie zum Verlauf der Degradation spezifischer mRNAs zu treffen. Dazu wurden als Voruntersuchung für die Arbeit mit dem Material Toter zur Eingrenzung des Todeszeitpunktes Untersuchungen zur Stabilität einzelner Abschnitte spezifischer mRNAs durchgeführt, die aus bis zu 178 Tagen bei Raumtemperatur gelagertem Blut sechs lebender Personen isoliert sowie mit verschiedenen Methoden amplifiziert und quantifiziert wurden. Hierbei wurde Gesamt-RNA zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnen und die Menge an mRNA von drei Genen [Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), Beta-Aktin (ACTB), Interleukin-1-Beta] einerseits durch Real-Time-PCR (Beta-Aktin) und andererseits für alle drei mRNA-Abschnitte mittels Fragmentlängenanalyse nach Reverser-Transkriptase-PCR quantifiziert und in Abhängigkeit von der Lagerdauer analysiert.

Zwischen der Lagerungszeit von Blut und den darin enthaltenen mRNA-Mengen konnte ein klarer Zusammenhang nachgewiesen werden, wobei Amplifikate von Interleukin-1-Beta nach 13 Tagen nicht mehr generierbar waren.

GAPDH-mRNA lieferte die besten langfristigen Ergebnisse hinsichtlich der Auswertung nach Fragmentlängenanalyse. Eine eindeutige Verringerung der Amplifizierbarkeit des Beta-Aktin-

Produktes konnte mit Hilfe der Real-Time-PCR gezeigt und ein Zusammenhang zur Lagerdauer mit Hilfe der RNA-Menge beziehungsweise des Ct-Wertes bestimmt werden. Bei dieser Fragestellung hat sich der Einsatz der Real-Time-PCR gegenüber der Fragmentlängenanalyse als technisch überzeugender erwiesen.

Zusammenfassend konnte die Studie aufzeigen, dass RNA aus Blutproben, die bei Raumtemperatur gelagert wurden, viel stabiler ist als bisher angenommen. Die Degradation hängt hierbei von der jeweiligen RNA ab und verläuft jeweils mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Diese Informationen können zur Untersuchung der RNA-Qualität in Diagnostik und Forschung genutzt werden. Außerdem kann die vorgestellte Methode die Grundlage für die Erarbeitung einer Degradationskurve des Blutes toter Personen sein.

Weiterführend wäre zu untersuchen, inwieweit die Ergebnisse der lebenden Personen übertragbar sind. In Abhängigkeit von den Umgebungsbedingungen könnte es gelingen, die betrachteten Systeme so spezifisch anzupassen, dass damit die bisherigen Eingrenzungsmethoden des Todeszeitpunktes ergänzt würden.

2 Einleitung

2.1 Zweck und Genauigkeit der Todeszeitbestimmung

Die möglichst exakte Bestimmung des Todeszeitpunktes eines Menschen ist nicht nur bedeutsam im Hinblick auf kriminalistische Ermittlungen zu Tathergang, Rekonstruktion und Stichhaltigkeit von Alibis, da der Zeitpunkt des Todes oft dem der Tat entspricht, sondern auch immer häufiger wichtig, um Aussagen zur Einhaltung versicherungsrechtlicher und juristischer Fristen sowie zur Erbschaftsfolge bei zeitnahe Tod mehrerer Erbberechtigter oder in Erbfolge stehender Personen zu treffen.

Die vielfältigen klassischen Methoden beziehen sich vor allem auf das frühe postmortale Intervall. Die Ungenauigkeit steigt mit zunehmender Liegezeit. Bisher sind aus der Beurteilung der späten Leichenveränderungen kaum Informationen zu gewinnen.

Nach den Untersuchungen von HENSSGE (Henssge et al. 2002) ist die Leichenliegezeit am exaktesten zu ermitteln, indem die Informationen verschiedener Parameter im Zusammenhang ergänzend betrachtet werden (Abbildung 1). Hierzu zählen die Temperaturveränderung der Leiche, die Leichenstarre (Rigor mortis), die Veränderlichkeit der Leichenflecken, der so genannten Livores, (Mallach 1964, Henssge und Madea 1988) und supravitale Reaktionen, die durch elektrische Erregbarkeit der mimischen Muskulatur, durch mechanische Erregbarkeit der Skelettmuskulatur und durch Einflussnahme auf die Weite der Iris mit pharmakologischen Mitteln gekennzeichnet sind (Klein und Klein 1978, Henssge und Madea 1988). Die supravitale mechanische Erregbarkeit skelettaler Muskulatur teilt sich in zwei Mechanismen auf, die einzeln in die Betrachtung der Leichenliegezeit einfließen. Der idiomuskuläre Wulst, eine lokale Muskelkontraktion im Bereich eines mechanisch gesetzten Reizes, kann beispielsweise bis zu 13 Stunden nach dem Tode noch nachgewiesen werden (Dotzauer 1958, Henssge et al. 2002), wohingegen das Muskelphänomen nach Zsakó als phasischer Muskeleigenreflex nach zweieinhalb Stunden bereits erschöpft ist (Prokop 1990, Henssge et al. 2002).

CASE 11/87	DATE 12.01.87	TIME 10.00
<p>pm Lividity</p> <p>Beginning YES <input type="checkbox"/> 0 < 3 <input type="checkbox"/> NO</p> <p>Confluence YES <input type="checkbox"/> > 1 < 4 <input type="checkbox"/> NO</p> <p>Maximum YES <input checked="" type="checkbox"/> > 3 < 16 <input type="checkbox"/> NO</p> <p>Thumb pressure NO <input type="checkbox"/> > 1 < 20 <input checked="" type="checkbox"/> YES</p> <p>Rigor mortis</p> <p>Beginning YES <input type="checkbox"/> > 0.5 < 7 <input type="checkbox"/> NO</p> <p>Maximum YES <input checked="" type="checkbox"/> > 2 < 20 <input type="checkbox"/> NO</p> <p>Electrical excitability</p> <p>I Upper eyelid nasal part NO <input type="checkbox"/> > 5 < 22 <input type="checkbox"/> YES</p> <p>II $\frac{1}{2}$ upper eyelid NO <input type="checkbox"/> > 5 < 16 <input type="checkbox"/> YES</p> <p>III Whole upper eyelid NO <input type="checkbox"/> > 3.5 < 13 <input type="checkbox"/> YES</p> <p>IV Plus lower eyelid NO <input type="checkbox"/> > 3 < 8 <input checked="" type="checkbox"/> YES</p> <p>V Plus forehead NO <input checked="" type="checkbox"/> > 2 < 7 <input type="checkbox"/> YES</p> <p>VI Plus cheek NO <input type="checkbox"/> > 1 < 6 <input type="checkbox"/> YES</p> <p>Orbicularis oris muscle NO <input type="checkbox"/> > 3 < 11 <input type="checkbox"/> YES</p>		
<p>Nomogram</p> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="border: 1px solid black; width: 100px; height: 15px; margin-right: 5px;"></div> <div style="flex-grow: 1; position: relative;"> <div style="position: absolute; left: 0; top: -10px;">1</div> <div style="position: absolute; right: 0; top: -10px;">22</div> <div style="position: absolute; left: 50%; top: -10px;">11</div> </div> </div> <p>Routine 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22</p> <p>Supplement 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22</p>		
<p>Idiomuscular contraction NO <input type="checkbox"/> > 1.5 < 2.5 <input type="checkbox"/> YES Zsako's phenomenon</p> <p>Complete shifting of livores after turning the body NO <input type="checkbox"/> > 2 < 6 <input type="checkbox"/> YES Complete shifting of livores</p> <p>Re-establishment of rigor NO <input type="checkbox"/> > 2 < 8 <input checked="" type="checkbox"/> YES Re-establishment of rigor</p> <p>Atropine/Cyclopent NO <input checked="" type="checkbox"/> > 3 < 10 <input type="checkbox"/> YES Atropine/Cyclopent</p> <p>Incomplete shifting of livores after turning the body NO <input checked="" type="checkbox"/> > 4 < 13 <input type="checkbox"/> YES Idiomuscular contraction</p> <p>Mydriaticum Roche NO <input type="checkbox"/> > 5 < 24 <input type="checkbox"/> YES Incomplete shifting of livores after turning the body</p> <p>Acetylcholine NO <input type="checkbox"/> > 14 < 30 <input checked="" type="checkbox"/> YES Mydriaticum Roche</p> <p style="text-align: right;">Acetylcholine < 46 <input type="checkbox"/> YES</p>		
<p>RESULT > 4.5 < 8 hpm</p> <p>TIME OF DEATH between 02.00 and 05.30</p>		

Abbildung 1: Formblatt für die Todeszeitbestimmung mit Beispiel (Henssge et al. 2002).

Hauptaugenmerk bei der Gesamtbeurteilung liegt auf der Leichenabkühlung, die mit Hilfe des Rektaltemperatur-Todeszeit-Bezugsnomogrammes, das auf der Grundlage des Zwei-Exponenten-Modells (Marshall und Hoare 1962, Henssge und Madea 1988) zur Rückrechnung der Todeszeit beruht, ermittelt wird. Essentielle Faktoren für dessen Anwendung stellen die tiefe Rektaltemperatur, die Umgebungstemperatur und das Körpergewicht dar, welches in Abhängigkeit von den Bedingungen des Auffindens mit Korrekturfaktoren versehen wird.

Voraussetzungen für eine genaue Kalkulation mit der Temperaturmethode beziehen die relative Konstanz der Umgebungstemperatur zwischen mutmaßlichem Todes- und Messzeitpunkt, das Fehlen einflussreicher Wärmestrahlungsverhältnisse sowie agonaler Hyper- und Hypothermie beim Verstorbenen ein.

Das experimentell gewonnene Modell der Temperatur-Zeit-Kurven hat deshalb den Nachteil, dass es nur auf die Fälle exakt zutrifft, die während des Abkühlens den gleichen Bedingungen, den Bezugsstandardbedingungen (Henssge und Madea 1988), unterliegen (Mall 2000). Zur Adaptation auf abweichende Körpergewichte und die Temperatur beeinflussende Körperbedeckungen wurde zunächst der Körpergewichts-Korrekturfaktor eingeführt. Bei starken Schwankungen der Umgebungstemperatur oder Umlagerung der Leiche stellen sich trotzdem

Schwierigkeiten der Methode ein (Henssge et al. 2000). Des Weiteren wird zwar das Körpergewicht aber nicht das Verhältnis zwischen Körpergröße und Körpergewicht berücksichtigt, das die Abkühlung beeinflusst.

2.1.1 Ergänzungen durch das physikalische Modell

Die Probleme, die sich bei der Anwendung der temperaturorientierten Todeszeitbestimmung zeigten, lieferten Ansatzpunkte für die physikalische Betrachtung der Leichenabkühlung. MALL entwickelte eine Methode, die Mechanismen der Wärmeabgabe in Form von Strahlung, Konduktion und Konvektion anhand physikalischer Gesetzmäßigkeiten zu berechnen und dabei vor allem Besonderheiten wie Körperposition, geometrische Bedingungen, Fieber oder Unterkühlung vor dem Tode und Umgebungsumstände wie Einstrahlung auf den Körper zu berücksichtigen (Mall 2000). Die rechnerische Aufteilung des geometrischen Areal nach der Methode der finiten Elemente in einzelne mit mathematischen Funktionen und Parametern beschreibbare Abschnitte bewirkte eine Reduktion der Anzahl nicht berechenbarer Fälle. Es besteht auch die Möglichkeit, die unterschiedlichen Gewebearten nachzumodellieren, so dass eine präzisere Anpassung an unterschiedliche Konstitutionstypen mit differierenden Verhältnissen zwischen Körpergröße und Körpergewicht vorgenommen werden kann.

Für Fälle mit längerem PMI, bei welchem die Körpertemperatur bereits auf Raumtemperatur gesunken ist, können die oben genannten Methoden folglich nicht mehr zur Anwendung gelangen. Es besteht deshalb weiterer Bedarf an intensiver systematischer Forschungsarbeit.

2.1.2 Biochemische Analysen zur Todeszeitbestimmung

Neben den morphologischen Verfahren wurden anhand verschiedener Körperflüssigkeiten wie Blut, Liquor oder Glaskörperflüssigkeit aber auch an Organen Versuche vorgenommen, die Todeszeit mit biochemischen Methoden einzugrenzen. Die Veränderungen von Hämoglobin-Gehalt, Viskosität, osmotischer Resistenz, Zellvolumen, Gerinnungseigenschaften und pH-Wert sowie die Menge an bestimmten Verbindungen wie Histidin, Hypoxanthin und Xanthin, Kreatinin, Laktat, anorganischen Stoffen zum Beispiel Kalium sowie von Enzymaktivitäten wurden schon lang von vielen Autoren beforscht (Mallach und Laudahn 1964, Schleyer 1967, Henry und Smith 1980). Leider war es bei älteren Untersuchungen häufig nicht möglich, dabei einen ausreichend engen Zusammenhang zur Leichenliegezeit herzustellen. Auch die Testbatterie von Schourup, die mehrere Parameter wie axilläre Temperatur und biochemische Analysen kombinierte, konnte sich nicht durchsetzen. In den vergangenen Jahren hingegen wurden deutliche Korrelationen der Kalium- und der Hypoxanthinkonzentration in der

Glaskörperflüssigkeit mit dem postmortalen Intervall aufgezeigt (Madea et al. 1994, James et al. 1997, Munoz Barús et al. 2002, Vass et al. 2002). Dennoch fanden diese Methoden kaum Eingang in die Routinearbeit, was wohl der bei einigen Varianten und Arbeiten anfänglich hohen Streuung der Messwerte und der durch relativ großen Aufwand bedingten Reduktion der Praktikabilität in der täglichen Routinearbeit zu schulden ist. Gründe für die Schwankungen liegen unter anderem in der erheblichen Anzahl schwer zu ermittelnder Einflussfaktoren. Andererseits stellt auch die Berücksichtigung bekannter Einflussvariablen einen erheblichen Arbeitsaufwand dar.

2.1.3 Entomologische Diagnostik

Hinweise auf die Leichenliegezeit, den Lagerungsort, den Tatort, eventuelle Vernachlässigung zu Lebzeiten und die Leichenverbringung kann die Besiedelung und Beschädigung des Körpers durch Insekten und andere Gliedertiere geben, die den Leichnam als Brutstätte, Nahrungsquelle und Lebensraum nutzen. Hierbei sind neben der Kenntnis der jeweiligen Entwicklungszyklen, ihrer speziestypischen Temperaturoptima und der zeitlichen Abfolge ihres Auftretens am Leichnam (Sukzession) auch das weitere biologische Verhalten, beispielsweise die Nahrungs- und Habitatpräferenzen, in die Befundinterpretation mit einzubeziehen. Zahlreiche weitere Faktoren wie Klima, Luftfeuchtigkeit und Fressfeinde nehmen zusätzlich Einfluß. Beispielsweise legen manche nekrophagen Fliegen teilweise unmittelbar postmortal Eier oder lebende Larven am Leichnam ab. Die Feststellung des Entwicklungsalters der Insekten erlaubt Rückschlüsse auf den Besiedelungszeitpunkt und somit auf die Todeszeit. Die aufgrund der Nahrungspräferenzen dieser Tiere bevorzugte Lokalisation im Gesichtsbereich ermöglicht die Feststellung der postmortalen Besiedelung. Bei der Begutachtung ist jedoch auch die Zugänglichkeit des Leichnams zu berücksichtigen. (Benecke 2004).

2.1.4 Molekularbiologische Methoden

Schon seit längerer Zeit wird nun versucht, anhand von DNA Veränderungen (Perry et al. 1988, Payne et al. 1999, Lin et al. 2000, Liu et al. 2001, Chen und Cheng 2002) unter Verwendung von menschlichen und tierischen Zellen Aussagen zum PMI zu treffen. Mit Hilfe der Einzelzell-Gelelektrophorese (single-cell gel electrophoresis, SCGE), die auch unter der Bezeichnung „comet assay“ bekannt ist, wurden Leukozyten, Muskelzellen und andere Organe auf die Degradation von DNA hin untersucht. Eine sequentielle, zeitabhängige Fragmentation in Abhängigkeit vom PMI konnte für Leukozyten im Intervall von 2 bis 22 h post mortem und für

Muskelzellen von 3 bis 56 Stunden post mortem festgestellt werden (Johnson und Ferris 2002). Die Gesamtuntersuchung belief sich auf das frühe PMI bis zu einer Dauer von drei Tagen. Auch die Analyse anhand der Durchflusszytometrie (Cina SJ 1994, Di Nunno et al. 1999, Di Nunno et al. 2002) zeigte einen Zusammenhang zur Leichenliegezeit innerhalb des frühen postmortalen Intervalls.

DNA als Träger unserer Erbsubstanz liegt innerhalb der Zellen lediglich in doppelter Ausführung vor. RNA als Mittler zwischen DNA und endgültigem Genprodukt hingegen kann in Form tausender Kopien repräsentiert sein, was die Chance auf erfolgreichen Nachweis massiv erhöht.

Die Untersuchungen an RNA gingen zunächst von der klinischen Fragestellung aus, inwieweit eine postmortale Verzögerung der Materialgewinnung und der RNA-Analyse die gewünschte Diagnostik beeinträchtigt (Lukiw et al. 1990, Phang et al. 1994) oder ob es Unterschiede zwischen vital und postmortal entstandenen Veränderungen gäbe (Ohshima und Sato 1998). Hierbei erbrachte oben genannte Studie von LUKIW als interessanten Nebeneffekt die Feststellung, dass jede untersuchte RNA-Spezies ihre einzigartige und charakteristische Zerfallskinetik habe. Andere Autoren konnten zeigen, dass RNA postmortal über mindestens vier Tage nachweisbar ist (Johnston et al. 1997, Marchuk et al. 1998, Schramm et al. 1999, Cummings et al. 2001, Yasojima et al. 2001, Trotter et al. 2002).

Von der Warte der Rechtsmedizin aus betrachtet, lassen diese Ergebnisse vermuten, dass sich ein Zusammenhang zwischen der Intaktheit der RNA und dem postmortalen Intervall finden lassen könnte. Durch den Vergleich mehrerer RNA-Subtypen gleichzeitig könnte man eine Art Degradationsmuster und eventuell durch Verwendung kurz- und langlebiger RNAs sogar eine Aussage über das frühe bis hin zum späten postmortalen Intervall herleiten. Studien, die diese Auffassung teilten und Versuche mit mRNA durchführten, kamen an verschiedenen Spezies und Geweben zu dem Ergebnis, dass sich Zusammenhänge zwischen mRNA-Mengen und der Leichenliegezeit ergeben (Inoue et al. 2002, Bauer et al. 2003a, Catts et al. 2005, Zhao et al. 2005). Die Untersuchungen beinhalteten eine maximale Lagerdauer von sieben Tagen. In einem Versuch zur Bestimmung des Alters getrockneter Blutflecken gelang es Bauer et al. sogar, bis zu 15 Jahre alte RNA zuzuordnen (Bauer et al. 2003b). Eine längere Aufarbeitung erscheint daher lohnenswert.

Auf Grundlage der genannten Erkenntnisse soll diese Arbeit unter definierten Rahmenbedingungen, die zunächst möglichen Einflussparameter wie bakterielle Besiedelung und Temperaturschwankungen außer Acht lassen sowie die Degradation von RNA in Abhängigkeit von der Lagerungszeit menschlichen Materials prüfen, um deren Stabilität an sich zu analysieren und ein geeignetes System des Nachweises zu entwickeln. Hierbei soll auch geprüft werden, wie

lang RNA überhaupt nachweisbar ist und ob es diesbezüglich Unterschiede zwischen verschiedenen mRNAs gibt.

2.2 mRNA und house-keeping Gene

Zur Untersuchung bieten sich so genannte house-keeping Gene an, da sie als Mediatoren im Zellstoffwechsel unabdingbar sind, wenig reguliert und in allen Körperzellen konstant exprimiert werden (konstitutive Genexpression). Die meisten house-keeping Gene kodieren für intrazellulär benötigte Stoffe wie Proteine, Enzyme, ribosomale RNA, Zytoskelettbestandteile oder Bausteine wie Histone. Deshalb werden sie häufig für quantitative Untersuchungen an RNA als interner Standard verwendet (He et al. 1995, Thellin et al. 1999, El-Ghrably et al. 2001, Zhao et al. 2005). Im Bereich der forensischen Studien an Autopsiematerial haben sich die Genprodukte für Beta-Aktin (ACTB), Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) bewährt (Inoue et al. 2002, Bauer et al. 2003b, Heinrich et al. 2007). Ausgehend von oben genannter Überlegung, dass durch die Betrachtung verschiedener mRNA-Abschnitte ein Muster der Degradation entstehen könnte, wurde zusätzlich Interleukin-1-Beta als induzierbare mRNA, die eine rasche postmortale Verminderung zeigt (Inoue et al. 2002), mit in diese Untersuchung einbezogen.

3 Zielsetzung der Untersuchung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht darin, Aussagen zur Stabilität spezifischer mRNAs, die einem Lagerungsprozess unterworfen wurden, treffen zu können. Es soll geprüft werden, ob und wie lange ein solcher Nachweis möglich ist und welche Unterschiede sich zwischen den einzelnen mRNA-Abschnitten herausstellen. Dabei geht es auch darum, ob eine Quantifizierung im zeitlichen Verlauf möglich ist, die als Voruntersuchung zur Eingrenzung des Todeszeitpunktes dienen könnte.

Für diese Fragestellung wurden Blutproben von sechs lebenden Personen abgenommen und bei Raumtemperatur gelagert. Zu definierten Zeitpunkten mit anfangs kürzeren Intervallen wurde jeweils aus einem Teil des Blutes eines jeden Probanden die Gesamt-RNA extrahiert. Drei ausgewählte mRNA-Abschnitte wurden dann amplifiziert und mit Hilfe zweier verschiedener Methoden, der Fragmentlängenanalyse und der Real-Time-PCR, quantifiziert. Die semiquantitativ ermittelte Produktmenge beziehungsweise der Ct-Wert bei der Real-Time-PCR wurden in Abhängigkeit von der Lagerdauer und der mRNA-Spezies analysiert. Hierbei sollte für diese Untersuchung auch der methodische Unterschied der Fragmentlängenanalyse mittels Kapillarelektrophorese und der quantitativen Real-Time-PCR betrachtet werden.

4 Material und Methoden zur Quantifizierung von mRNA

Als Untersuchungsmaterial wurde Blut gewählt, da es bei der Sektion aber auch ohne diese durch Punktion großer Gefäße relativ leicht gewonnen werden kann, im Gegensatz zu Knochen beispielsweise, einfach zu verarbeiten ist und Voruntersuchungen an Lebenden zulässt, ohne dass die Entnahme an erhebliche, medizinisch indizierte Eingriffe gebunden ist.

Die vorhandene Menge an nicht degradierter RNA wurde durch die Fragmentlängenanalyse eines 6-FAM-markierten Amplifikationsproduktes der RNA bestimmt und im Falle von Beta-Aktin auch mit Hilfe der Real-Time-PCR untersucht. Dazu wurden die Proben nach RNA-Isolation mittels Plexor™ One-Step qRT-PCR Systems von PROMEGA für die Real-Time-PCR verarbeitet beziehungsweise mittels des AccessQuick™ RT-PCR Systems von PROMEGA gemäß des Herstellerprotokolls vorbereitet und durch den ABI PRISM 310 Genetic Analyzer von APPLIED BIOSYSTEMS mit der entsprechenden Software ABI PRISM™ Gene Scan® 3.2.1 analysiert.

4.1 Übereinkünfte zur Vermeidung von Kontamination

Gemäß dem aktuellen Erkenntnisstand stellen die Bearbeitung des Ausgangsmaterials und die Extraktion der darin enthaltenen Nukleinsäuren den wichtigsten Schritt zur Vermeidung von Kontamination und Degradation der Proben dar (Wilson et al. 1995, Surzycki 2000). Daher wurde bei diesem und folgenden Arbeitsschritten auf die Einhaltung der prinzipiellen Richtlinien für Arbeit mit DNA der Kommission der International Society for Forensic Genetics (Bär et al. 2000) und auf die zusätzlichen Erfordernisse des Umgangs mit RNA (Eldadah und Asher 1995) große Sorgfalt gelegt. So wurden neben der üblichen Arbeitsplatzhygiene sterile, teilweise gestopfte und aerosoldichte Pipettenspitzen, sowie sterile Gefäße und Lösungen verwendet, um eine Kontamination mit ubiquitär vorkommenden Ribonukleasen zu verhindern.

Bei allen Arbeitsschritten der Extraktion und Amplifikation wurde auf das Tragen von Laborbekleidung, Handschuhen, die häufig gewechselt wurden (Larrick und Siebert 1995), und Mundschutz geachtet. Außerdem wurden die Proben vor und nach der Amplifikation in getrennten Laboratorien bearbeitet.

Des Weiteren wurden bei jedem Reaktionsansatz je eine Positivkontrolle, zur Abschätzung des quantitativen Amplifikationserfolges bei der Elektrophorese, und eine Negativkontrolle, die alle Reagenzien mit Ausnahme der RNA enthält, mitgeführt. Zeigte Letztere in einem seltenen Fall im PAA-Gel Spuren eines Amplifikationsproduktes, wurden alle Proben dieses Reaktionsansatzes verworfen und neu bearbeitet.

4.2 Herkunft der Proben

Für die Untersuchung wurde RNA aus EDTA-Blut isoliert und der Gehalt an spezifischer mRNA zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Blutentnahme analysiert. Die Vorversuche hierzu erfolgten mit anonymisierten Blutproben, die im Rahmen von Paternitätsbestimmungen im Institut für Rechtsmedizin der Friedrich-Schiller-Universität Jena asserviert worden waren. Die jeweiligen Untersuchungen erfolgten zeitnah zur Blutentnahme.

Zur Durchführung des Alterungsversuches wurden Blutproben von je drei Männern und Frauen im Alter von 23 bis 55 Jahren ohne Zeichen bestehender Infekte oder Erkrankungen untersucht, die sich freiwillig nach Aufklärung und Zustimmung als Probanden zur Verfügung stellten.

Die Entnahme der Proben erfolgte in jeweils sechs 9 ml-Monovetten, die sofort nach der Abnahme vorsichtig geschwenkt wurden, um eine optimale Vermischung von Vollblut und EDTA zu erreichen. Lediglich bei Person 2 wurde eine etwas zu geringe Blutmenge asserviert, die die Extraktion nur bis zu einer Lagerdauer von 12 Tagen ermöglichte.

4.3 Besondere Vorsichtsmaßnahmen beim Arbeiten mit RNA

Bei der Probenentnahme wurde darauf geachtet, dass die Umgebungsbedingungen für alle Probanden gleich bleibend waren und keine mechanische Alteration der Blutzellen, wie sie zum Beispiel durch zu lange Stauung des venösen Blutes erfolgen kann, eintrat. Die derartige Alteration der Zellmembran kann zur Eröffnung von membrangebundenen Zellorganellen führen, wodurch interne Ribonukleasen freigesetzt würden. Diese Enzyme sind häufig äußerst stabil und benötigen keine Cofaktoren zur Ausübung ihrer Funktion.

4.4 Lagerungsbedingungen

Alle Entnahmeröhrchen wurden im Intervall zwischen den einzelnen Extraktionszeitpunkten stehend in Styroporblöcken gelagert, wobei die Raumtemperatur von 22 °C dauerhaft nicht um mehr als 1 °C unter- oder überschritten wurde. Die Styroporblöcke befanden sich in einem bedeckelten Karton, der in einem Aufbewahrungsschrank stand, so dass die Röhrchen weitestgehend licht- und windgeschützt alterten.

4.5 RNA-Extraktion aus dem Probenmaterial

Die Präparation der Proben erfolgte mit dem SV Total RNA Isolation System von PROMEGA. Die Verwendung des Kits und die Vorbereitung der Lösungen entsprachen den Angaben des

Herstellers mit der Modifikation, dass statt 95-prozentigen Alkohols zur Aufnahme des Lysates absoluter Alkohol verwendet wurde.

4.5.1 Herstellung des Lysates

Aus den EDTA-Blutproben wurden pro Person und Extraktionszeitpunkt je zwei RNA-Extrakte hergestellt, im folgenden Extrakt 1 und Extrakt 2 genannt. Pro Extrakt wurde ein autoklaviertes Reaktionsgefäß mit einem Milliliter Vollblut, das vorher durch Schwenken des Entnahmeröhrchens homogenisiert wurde, versehen. Durch Zentrifugation bei 4.500 g über fünf Minuten wurden die zellulären Bestandteile am Röhrchenboden gesammelt und der Überstand von etwa 300 µl vorsichtig abpipettiert und verworfen, ohne das Zellpellet zu berühren.

Nach Zugabe von 1 ml Red Blood Cell Lysis Solution ist das Sediment durch saches Pipettieren erneut gelöst und der Zentrifugationsvorgang wiederholt worden. Danach wurde 1 ml Überstand abpipettiert und verworfen. Nun ist der Vorgang der Zugabe von Erythrozytenlysereagenz, Resuspension, Zentrifugation, Abpipettieren und Verwerfen des Überstandes noch zweimal wiederholt worden. Jetzt wurde der Überstand bis auf etwa 100 µl komplett abpipettiert und das verbleibende Präzipitat mit 175 µl SV RNA Lysis Buffer versehen und resuspendiert.

Anschließend wurden 350 µl SV RNA Dilution Buffer hinzugefügt und durch Schwenken des Eppendorf-Reaktionsgefäßes mit der Zelllösung vermischt. Die Proben sind daraufhin für drei Minuten in einem 70 °C warmen Heizblock inkubiert und danach sofort bei Raumtemperatur zehn Minuten lang bei 16.000 g zentrifugiert worden. Das geklärte Lysat wurde in ein neues steriles Reaktionsgefäß pipettiert.

4.5.2 Reinigung der RNA

Das Lysat wurde mit 200 µl absolutem Ethanol versetzt, durch drei- bis viermaliges Pipettieren vermischt, anschließend in die Reinigungssäule mit Sammelröhrchen überführt und bei 16.000 g für eine Minute zentrifugiert, um die RNA an die Säulenoberfläche zu binden.

Der Überstand im Sammelröhrchen ist verworfen worden. Die Säule wurde nun wieder in das Sammelröhrchen zurückgeführt, es wurden 600 µl SV RNA Wash Solution hinzugefügt und eine erneute Zentrifugation bei 16.000 g für eine Minute angeschlossen. Auch dieser Überstand wurde abpipettiert und verworfen, Säule und Sammelröhrchen wieder zusammen gesteckt und nun 50 µl des frisch hergestellten DNase incubation mix direkt auf die Membran der Reinigungssäule aufpipettiert, die komplett benetzt sein sollte. Diese Lösung setzte sich aus je 40 µl Yellow Core Buffer, 5 µl 0,09 M MnCl₂ und 5 µl des Enzyms DNase I zusammen. Die Bestandteile sind in obiger Reihenfolge zusammengefügt und vorsichtig durch Pipettieren vermischt worden. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei 20-25 °C wurde die Säule mit 200 µl DNase Stop

Solution versehen und bei 16.000 g eine Minute lang zentrifugiert.

Danach sind die Proben mit 600 µl SV RNA Wash Solution durch einen anschließenden Zentrifugationsschritt von einer Minute bei 16.000 g gewaschen worden. Das Sammelröhrchen wurde geleert, wieder mit der Säule verbunden und ein erneuter Waschschrift mit 250 µl SV RNA Wash Solution durchgeführt, wobei die Zentrifugationszeit zwei Minuten betrug.

Die Reinigungssäule wurde nun in ein frisches Elutionsröhrchen transferiert und die gereinigte RNA mit 100 µl nuklease-freiem Wasser, das auf die Säule pipettiert wurde, bei einer Zentrifugationszeit von einer Minute bei 16.000 g eluiert.

Die extrahierte RNA wurde bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C gelagert.

4.6 RNA-Quantifikation durch spektrophotometrische Analyse

Von jeder Probe wurden 35 µl RNA-Extrakt mit 35 µl nuklease-freiem Wasser versehen, durch Pipettieren vermischt und in die Messkammer des Gerätes Gene quant Pro eingeführt. Es wurde eine Quarzküvette mit 10 mm Schichtlänge verwendet. Die Kalibrierung des Photometers erfolgte zunächst mittels der mit 70 µl nuklease-freiem Wasser gefüllten Küvette. Die Messung erfolgte bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum von RNA, und bei 280 nm, um sowohl Menge als auch Reinheit der RNA, die aus dem Quotienten der gemessenen Absorption von 260 nm und 280 nm hervorgeht, beurteilen zu können. Jede Probe wurde dreimal gemessen und aus den Daten der Mittelwert berechnet.

Die Spannbreite der Konzentration der 32 RNA Proben der Voruntersuchungen reichte von 2,18 bis 18,72 ng/µl bei einem Reinheitsquotienten von 1,583 bis 2,231. Der Referenzbereich hierfür lag bei 1,7 bis 2,1. Es war kein Zusammenhang zwischen der gemessenen Konzentration oder dem Reinheitsquotienten mit dem Erscheinen und der Güte der Produktbande für Beta-Aktin zu erkennen. Gleiche Mengen an RNA erbrachten deutlich voneinander abweichende PCR-Ergebnisse. Eine Analyse weiterer Proben wurde deshalb nicht durchgeführt.

4.7 RT-PCR der mRNA-Fragmente

Verwendet wurde für jedes der spezifischen mRNA-Fragmente der Kit AccessQuick™ RT-PCR-System von PROMEGA, die Primer lieferte die QIAGEN Operon GmbH, Köln.

Die resultierenden Produkte sollten eine Länge von 200 bp nicht überschreiten, da die Wahrscheinlichkeit erfolgreicher Amplifikation dadurch höher ist, und folgende weitere Bedingungen erfüllen:

- Individuelle Variationen der Sequenz im Primerbereich sollten nicht bekannt sein.

- Primerlänge 20 – 30 Nukleotide
- ähnlicher A/T und G/C Gehalt von sense und antisense Primer, damit die optimalen Annealingtemperaturen beider Primer nah beieinander liegen
- Vermeiden von Primern, die intra- und intersträngige Sekundärstrukturen bilden, wodurch es zu Primerdi- oder sogar -polymeren kommen kann (Wu et al. 1991)
- Vermeiden der Ähnlichkeit der gewählten Sequenz mit anderen Transkripten, um unspezifische Amplifikationen zu unterbinden

Bei der Amplifikation wurden template-komplementäre Primer eingesetzt, die intron-übergreifend ausgewählt wurden, so dass die Hybridisierung mit eventuell doch vorhandener gDNA deutlich längere Amplifikationsfragmente generiert hätte (Bauer et al. 2003b). Diese Methode wird als „intron-differential RT-PCR“ bezeichnet (Larrick und Siebert 1995). Alle Primer wurden hinsichtlich der ungünstigen Fähigkeit loops und hairpins zu bilden mit spezieller Software (Generunner) untersucht und nach oben genannten Kriterien, die von SURZYCKI (2000) und LARRICK (1995) für eine effiziente Amplifikation empfohlen wurden, aus der Vielzahl bekannter Primerpaare ausgewählt. Die verwendeten Primer wurden zum Teil bereits in der Literatur beschrieben (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Auflistung der Primerpaare für die Amplifikation der einzelnen mRNA-Fragmente

Target	Primer- richtung	Sequenz (5' → 3')	Primerreferenz	Referenzsequenz
Interleukin-1-Beta	vorwärts	CTG ATG GCC CTA AAC AGA TGA AG	Brink et al. 2000	Bensi et al. 1987
	rückwärts	GGT CGG AGA TTC GTA GCT GGA T		
GAPDH	vorwärts	TGG GTG TGA ACC ATG AGA AG	Brink et al. 2000	Ercolani et al. 1988
	rückwärts	GCT AAG CAG TTG GTG GTG C		
Beta-Aktin	vorwärts	ATC CAC GAA ACT ACC TTC AAC TC	Bauer et al. 2003b	Nakajima-Iijima 1985
	rückwärts	GAG GAG CAA TGA TCT TGA TCT TC		

Die rückwärts gerichteten Primer eines jeden Paares wurden zur Detektion am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzmarker 6-FAM markiert.

Alle Primer wurden entsprechend der Empfehlung des Herstellers in destilliertem Wasser (Ampuwa) gelöst, auf eine Konzentration von 100 µM gebracht, über Nacht im Kühlschrank

aufbewahrt und anschließend tief gefroren bei -20 °C gelagert. Vor der Verwendung wurde eine Primergebrauchslösung hergestellt, deren Konzentration 10 µM betrug.

Die PCR erfolgte für jedes Fragment mit dem AccessQuick™ RT-PCR System von PROMEGA in einem 25 µl Ansatz mit folgender Zusammensetzung:

- 1 µl RNA-Extrakt
- 12,5 µl AccessQuick™ Mastermix (enthält Tfl DNA Polymerase, dNTPs, MgCl₂ und Reaktionspuffer)
- 1,25 µl Primer 1 (10 µM)
- 1,25 µl Primer 2 (10 µM)
- 0,5 µl (2,5 U) AMV Reverse Transkriptase

Fehlendes Volumen wurde mit Aqua bidestillata aufgefüllt. Um auch bei den Negativkontrollen das gleiche Volumen zu erhalten, wurde anstelle der RNA die entsprechende Menge an bidestilliertem Wasser zugegeben. Als Positivkontrolle diente eine RNA-Probe mit bekannter Amplifizierbarkeit. Es wurde für jede Person zu jedem Zeitpunkt eine PCR durchgeführt, für die RNA von Extrakt 1 verwendet wurde.

Die PCR-Reaktion fand in einem Thermocycler unter spezifischen Bedingungen für den jeweiligen mRNA-Abschnitt statt. Die Reihenfolge der Schritte war für jedes Amplifikat gleich, bestehend aus reverser Transkription, gefolgt von 35 Zyklen mit den Schritten Denaturierung, Annealing und Extension. Die abschließende Extension und die Kühlung beendeten die PCR.

Die Spezifität der Primer wurde für jedes mRNA-Fragment mittels Sequenzierung überprüft. Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mit dem QIAquick™ PCR-Purification Kit von QIAGEN entsprechend des Herstellerprotokolls. Mit Hilfe des Big Dye™ Terminator Sequencing Kits von APPLIED BIOSYSTEMS wurde die Sequenzierreaktion analog zur Produktempfehlung im ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer mit unmarkierten Amplifikationsprimern und der entsprechenden Analyse-Software durchgeführt. Die entstandenen Elektropherogramme wurden anschließend mit der Referenzsequenz abgeglichen und bestätigten das gewünschte Amplifikationsprodukt.

4.7.1 Amplifikation von Interleukin-1-Beta

Interleukin-1-Beta, das durch auf Chromosom 2 vorhandene DNA kodiert wird, gehört zur Familie der Interleukin-1-Zytokine. Diese werden als Proprotein, das mittels Kaspase 1 in seine aktive Form gespalten wird, von aktivierten Makrophagen synthetisiert. Interleukin-1-Beta stellt einen Mediator der Entzündungsantwort dar und ist beteiligt an zahlreichen zellulären Aktivitäten

wie der Proliferation, Differenzierung und Apoptose. Das amplifizierte Fragment der mRNA von Interleukin hatte eine Länge von 87 Nukleotiden intronübergreifend von Exon 3 auf Exon 4 (Referenzsequenz NM_000576.2 Position 164-186, 229-250).

Der Ansatz der PCR für Interleukin-1-Beta erfolgte von vornherein mit 25 µl Gesamtvolumen wie oben beschrieben, wobei zunächst die Empfehlungen von BRINK (Brink et al. 2000) zur Amplifikation des gewählten Fragmentes komplett übernommen worden sind: 60 °C (30 min), [94 °C (20 s), 59 °C (1 min)] x 40, Lagerung bei 4 °C bis zur weiteren Verarbeitung.

Um mögliche Verbesserungen der Amplifikation zu prüfen wurde nacheinander je ein Parameter verändert. Die Annealingtemperatur ist auf 55 °C gesenkt, die Annealingdauer auf 90 s erhöht und die Dauer der reversen Transkription auf 45 min gesenkt worden. Des Weiteren wurden die Amplifikationsbedingungen des Beta-Aktin Fragmentes angewendet, wobei wiederum sukzessive jeweils ein Parameter verändert wurde. Die Zyklenzahl wurde auf 32, 35 und 40 festgesetzt, die Annealingtemperatur auf 66 °C und 68 °C erhöht, die Annealingdauer auf 35 s, 1 min und auf 90 s gebracht, die Synthesedauer um 15 Sekunden verlängert und um 10 s verkürzt. Es wurde untersucht, inwieweit sich eine Verdopplung der Primermenge auf die Bandenintensität auswirkt. Für die Untersuchungen wurden endgültig folgende Amplifikationsbedingungen festgelegt: 48 °C (45 min), [95 °C (2 min), 66 °C (1 min 30 s), 70 °C (1 min)] x 35, 70 °C (5 min), 4 °C bis zur weiteren Verarbeitung.

Um die mögliche Nachweisbarkeitsdauer einschätzen zu können und die Empfindlichkeit des für Interleukin-1-Beta konstruierten Systems zu prüfen, wurden Verdünnungsuntersuchungen mit mehreren nicht degradierten RNA-Extrakten durchgeführt. Diese Verdünnungen verschiedener RNA-Lösungen entsprachen den spektrophotometrisch ermittelten Ausgangsmengen von 18 ng bis 180 fg Gesamt-RNA. Die Analyse erfolgte durch visuelle Auswertung der PAA-Gele und durch Fragmentlängenanalyse der FAM-markierten Amplifikate mit Hilfe der automatisierten Kapillarelektrophorese. Auch für die anderen Systeme GAPDH und Beta-Aktin wurden diese Proben für die Verdünnungsuntersuchungen verwendet.

4.7.2 Amplifikation von GAPDH

Das zugrunde liegende Gen befindet sich auf Chromosom 12. Nach der Translation resultiert das tetramere Enzym GAPDH, welches die reversible oxidative Phosphorylierung von Glyceralaldehyd-3-Phosphat in Gegenwart von anorganischem Phosphat und Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) katalysiert und damit besondere Bedeutung im Kohlenhydratstoffwechsel hat. Der amplifizierte mRNA-Abschnitt von GAPDH war 76 Nukleotide lang und beinhaltete Abschnitte von Exon 6 und 7 (Referenzsequenz NM_002046.3,

Position 473-492, 530-548).

Der Ansatz erfolgte wie oben beschrieben nach den Empfehlungen des verwendeten RT-PCR-Kits, jedoch zunächst mit einem Gesamtvolumen von 50 µl, welches später unter gleich bleibendem Verhältnis der Reaktionspartner auf 25 µl reduziert wurde. Die Annealingtemperatur für das Fragment wurde mit der ATGC-Regel kalkuliert.

Zur möglichen Optimierung der Reaktion wurden folgende Variationen der aufgeführten PCR Bedingungen jeweils einzeln vorgenommen: Erhöhung der Zyklenzahl auf 30, 32, 35 und 40 Zyklen, Änderung der Annealingtemperatur auf 55 °C und 61 °C, Verlängerung der Annealingzeit auf 60 s und 90 s, Steigerung der Syntheszeit auf 60 s und 90 s, Verkürzung der Dauer der reversen Transkription auf 30 min und Verlängerung des RT-Schrittes auf 60 min.

Die endgültigen für die Lagerungsuntersuchung verwendeten Amplifikationsbedingungen waren wie folgt: 48 °C (45 min), [95 °C (2 min), 58 °C (45 s), 70 °C (45 s)] x 35, 70 °C (5 min), Aufbewahrung bei 4 °C bis zur weiteren Verarbeitung.

Die Ausgangsmengen der verdünnten RNA-Extrakte zur Bestimmung der Nachweisgrenze betrugen 19 ng bis 180 fg. Die PAA-Gele wurden vergleichend betrachtet und eine Fragmentlängenanalyse der FAM-markierten Amplifikate durchgeführt.

4.7.3 Amplifikation von Beta-Aktin

Die DNA für Beta-Aktin befindet sich auf dem Chromosom 7 und kodiert eines der sechs verschiedenen Aktin-Proteine, die für die Zellstruktur, -integrität und -motilität bedeutsam sind. Das gewählte Beta-Aktin ist ein Hauptbestandteil des kontraktiven Apparates. Es wurde ein Fragment der mRNA von Beta-Aktin amplifiziert, das eine Länge von 179 Nukleotiden aufwies und von Exon 5 bis 6 reichte (Referenzsequenz X00351.1, Position 861-883, 1016-1038).

Die ursprünglichen Cyclerbedingungen orientierten sich an den Empfehlungen zu dem verwendeten PCR-Kit. Eine vorgegebene Spannbreite der Zeiten und Temperaturen ist hierfür jeweils im mittleren Bereich ausgewählt worden. Die Annealingtemperatur wurde mit Hilfe der ATGC-Regel ermittelt und zunächst ein Reaktionsansatz von 50 µl Gesamtvolumen hergestellt, der später unter Beibehaltung der Verhältnisse der Komponenten zueinander auf die Hälfte an Volumen reduziert wurde. Um mögliche Verbesserungen zu prüfen, erfolgte die Variation der zu verwendenden Primermenge. Es wurden 0,5 µl, 2,5 µl und 5 µl einer 10 µM Primerlösung eingesetzt. Des Weiteren ist die Zyklenzahl auf 32, 35 und 40 Zyklen erhöht worden.

Die endgültige Amplifikation dieses mRNA-Abschnittes von Beta-Aktin wurde in oben angegebenem Ansatz (siehe Abschnitt 4.7) unter folgenden Cyclereinstellungen durchgeführt: 48 °C (45 min), [95 °C (2 min), 64 °C (45 s), 70 °C (45 s)] x 35, 70 °C (5 min), 4 °C bis zur

weiteren Verarbeitung. Für die Vorversuche wurden im 25- μ l-Ansatz 3 μ l RNA verwendet und das Volumen von nuklease-freiem Wasser dementsprechend um 2 μ l reduziert.

Zur Einschätzung der Nachweisgrenze resultierten Ausgangsmengen der Verdünnungen an Gesamt-RNA von 18 ng bis 1,8 fg. Wiederum erfolgten die visuelle Auswertung der PAA-Gele und die Fragmentlängenanalyse.

4.8 Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Kontrolle des Amplifikates

Die gelelektrophoretische Auftrennung erbrachte den Nachweis einer erfolgreichen Amplifikation der RNA und zeigte auf, ob es zur Bildung zusätzlicher unspezifischer Banden gekommen war. Des Weiteren gab sie durch visuellen Vergleich der Bandenintensität relativ zueinander Auskunft über den Einfluss verschiedener PCR-Bedingungen und die dabei entstandene cDNA-Menge. Weiterhin führten sichtbare Banden der Negativkontrolle oder zusätzliche Banden zum Verwerfen aller Proben des entsprechenden Ansatzes.

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) mit anschließender Silberfärbung bietet hervorragende Trenneigenschaften und Sensitivität bei kleinen PCR-Produkten (Hagen-Mann und Mann 1994). Sie wurde deshalb ausschließlich verwendet. Die gebildeten cDNA-Moleküle wandern im alkalischen Milieu nach dem Auftragen auf das Gel entsprechend ihrer Größe und negativen Ladung im elektrischen Feld von der Kathode durch die dreidimensionale, poröse Matrix des Polyacrylamid-(PAA-)Gels zur Anode. Für die amplifizierten Fragmente mit einer Länge von 76 bis 179 Basenpaaren (bp) wurden bei der Elektrophorese 8,9-prozentige Gele verwendet. Die Stammlösung für die Herstellung einer Gelplatte enthielt folgende Lösungen und Konzentrationen:

- 9,9 ml Acrylamid / Bisacrylamid (Konzentration 30 %, Vernetzungsgrad 3 %)
Zusammensetzung: 363,75 ml 40-prozentiges Acrylamid und 4,5 g Bisacrylamid
mit Aqua bidestillata auf 500 ml aufgefüllt)
- 16,5 ml Aqua bidestillata
- 6,6 ml Tris-Sulfat-Puffer (35 mM, Zusammensetzung: 2,15 ml konzentrierte H_2SO_4 und 45,4 g Tris, pH 9, mit Aqua bidestillata auf 1.000 ml aufgefüllt)
- 231 μ l 10-prozentiges APS
- 11,7 μ l TEMED

Die Lösung wurde mit Hilfe von Glasplatten auf Trägerfolien gegossen, wobei die Polymerisation nach Zugabe der letzten beiden Substanzen bei Raumtemperatur innerhalb von zwei Stunden erfolgte. Bis zu ihrer Verwendung wurden die Gele im Kühlschrank aufbewahrt.

Jeweils 3 µl eines PCR-Produktes wurden auf Filterpapierblättchen pipettiert, die auf das PAA-Gel appliziert wurden, und somit in die Gelmatrix aufgenommen. Es erfolgte zudem die Mitführung von 5 µl einer 100-Basenpaar-Leiter (1:100 Verdünnung) als Größenstandard. Die Auftrennung der Proben verlief in einer Elektrophoresekammer bei Laufbedingungen von 1.000 V, 40 mA und 20 W, die während der Elektrophoresedauer automatisch konstant gehalten wurden. Zur Ladungsübertragung dienten Agarosegelstreifen, die Bromphenolblau zum Sichtbarmachen der Lauffront enthielten. Die Streifen wurden hergestellt, indem 300 ml Tris-Bor-Puffer (Zusammensetzung: 185 g Tris und 35,04 g Borsäure, auf zwei Liter Aqua bidestillata aufgefüllt) mit 6 g Agarose vermischt und für drei Minuten in einer Mikrowelle erhitzt wurden. Anschließend wurde die Lösung in eine Form gegossen.

4.9 Silbernitratfärbung der Polyacrylamid-Gele

Nach der Elektrophorese wurden die cDNA-Banden durch Silbernitratfärbung nach dem vereinfachten Protokoll von WESTERMEIER (Westermeier 1993) zur Darstellung gebracht. Dabei ist das PAA-Gel etwa 5 min lang mit 2,5-prozentiger Salpetersäure (HNO_3) inkubiert worden, bis der Indikator Bromphenolblau einen Farbumschlag von blau nach gelb zeigte. Anschließend wurde das Gel dreimal je 1 min lang mit Aqua bidestillata gespült und in einer Photoschale auf einem Schüttler 20 min lang in 2-prozentiger Silbernitratlösung (AgNO_3) mit einem Zusatz an Formaldehyd von 0,05 % gefärbt. Danach ist es wiederum dreimal je 1 min lang mit Aqua bidestillata gewaschen und unter Schwenken mit einer 2-prozentigen Natriumbicarbonatlösung (Na_2CO_3) mit einem Zusatz von 500 µl Formaldehyd auf 500 ml benetzt worden. Bis zum Sichtbarwerden der Banden wurde die Lösung mehrfach gewechselt, dann verworfen und die Reaktion mit 4,5-prozentiger Essigsäure (CH_3COOH) gestoppt. Abschließend erfolgte ein erneuter Waschschriff des PAA-Gels mit Aqua bidestillata. Die Visualisierung der Produktbanden fand an einem Leuchtpult statt. Im Anschluß wurde das Gel für einige Stunden in einer Glycerinlösung (Zusammensetzung: 187,5 ml Glycerin und 3 l Aqua destillata) eingelegt. Nachdem es luftgetrocknet war, erfolgte die Umhüllung mit Klarsichtfolie zur Aufbewahrung.

4.10 Semiquantitative Fragmentlängenanalyse mittels Kapillarelektrophorese

In jedes Teströhrchen sind 12 µl deionisiertes Formamid, 0,5 µl Längenstandard und 1 µl Amplifikatlösung pipettiert worden. Als Längenstandard wurden für die PCR-Produkte von Beta-

Aktin der genRES LS 500 Standard und für die Produkte von Interleukin-1-Beta und GAPDH der ILS 600 Standard benutzt.

Diese Ansätze wurden jeweils mit Septa verschlossen, kurz gevortext und luftblasenfrei bei 16.000 g für eine Minute zentrifugiert. Die Reaktionsgefäße wurden dann für drei Minuten in einem auf 95 °C geheizten Thermoblock denaturiert und anschließend drei Minuten lang auf Eis abgekühlt. Abschließend wurden die Teströhrchen in den ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer eingesetzt und die Elektrophorese unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- Injektionszeit/ Spannung: 5 s / 15 kV
- Laufzeit/ Spannung: 24 min / 15 kV
- Temperatur: 60 °C

Mit der entsprechenden Software GeneScan® 3.1.2. wurde die Länge der PCR-Produkte bestimmt. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung der ermittelten Peakflächeninhalte. Proben, deren Gehalt an PCR-Produkten das Analysemaximum von etwa 8.000 rfu der Software überstieg, wurden erneut verdünnt aufgetragen.

4.11 Quantitative Real-Time-PCR des Beta-Aktin-Fragmentes

Verwendet wurde das Plexor™ One-Step qRT-PCR System, das prinzipiell auch für Multiplex-PCR-Ansätze geeignet ist (Sherrill et al. 2004). Die Funktion beruht auf einer Abnahme der Fluoreszenz mit steigendem Primerverbrauch (Abbildung 2). Die fortschreitende Anreicherung des amplifizierten Produktes wird so als Verringerung der Signalintensität repräsentiert (Abbildung 3). Die Anzahl der PCR-Zyklen, die nötig ist, um eine signifikante Reduktion der Fluoreszenz festzustellen, wird Ct (Cycle Threshold) genannt und ist abhängig von der Ausgangsmenge an zu amplifizierender RNA (Williams und Tucker 1999). Die Menge an Template-RNA kann durch den Vergleich mit einer Standard-Kurve quantifiziert werden, die durch Amplifikation bekannter RNA-Mengen generiert wurde.

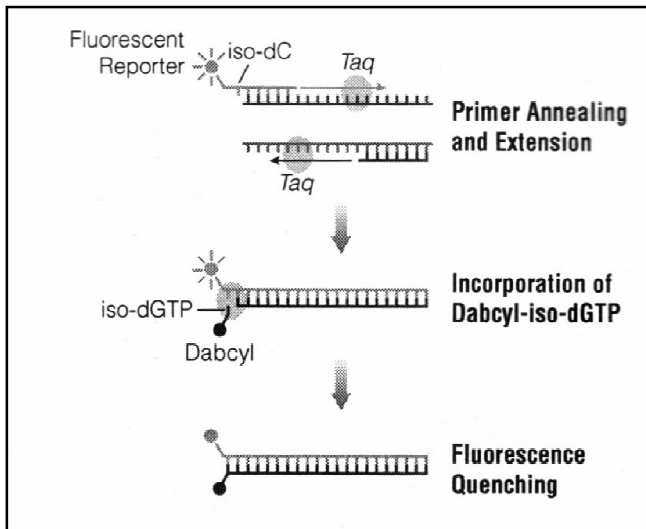


Abbildung 2: Darstellung der Funktionsweise des Plexorsystems (Promega Corporation 2006): Beim Einbau des markierten Primers wird das am 5'-Ende an das iso-dC-Nukleotid gebundene Fluoreszenzsignal dann gelöscht, wenn dabcyl-iso-dGTP, welches im Mastermix vorliegt, durch die Polymerase in den gebildeten Komplementärstrang an gegenüberliegender Position eingebaut wird. Hierbei fungiert Dabcyl als Fluoreszenzlöcher.

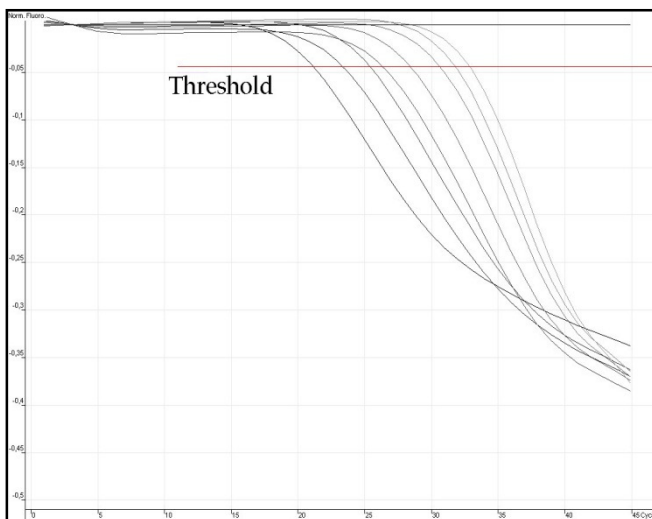


Abbildung 3: Beispiel der grafischen Darstellung der Real-Time-Daten: Der Cycle Threshold markiert den PCR-Zyklus, der eine signifikante Fluoreszenzveränderung generiert.

4.11.1 Amplifikationsbedingungen der Real-Time-PCR

Die PCR wurde mit oben genanntem Kit in folgendem Ansatz durchgeführt:

- 12,5 µl Plexor™ Master Mix, 2x
- 4,9375 µl nuklease-freies Wasser
- 0,5 µl RNasin® Plus RNase Inhibitor
- 0,0625 µl ImProm-II™ Reverse Transcriptase

zu dem RNA-Standard wurden weiterhin hinzugefügt:

- 4 µl MOPS-Puffer
- je 1 µl Reaktions-Primer (Konzentration 5 µM)
- 1 µl Standard-RNA der jeweiligen Verdünnung (50 µg/µl, 16,66 µg/µl, 5,55 µg /µl, 1,85 µg/µl, 0,62 µg/µl, 0,21 µg/ml, 0,07 µg/µl, 0,02 µg/µl)

zu den Proben wurden hinzu pipettiert:

- 4 µl MOPS-Puffer
- je 1 µl Reaktions-Primer (Konzentration 5 µM)
- 1 µl RNA-Extrakt

zu der Positiv-Kontrolle kamen hinzu:

- 1 µl Plexor™ Kanamycin Control Primer Pair, 25x
- 1 µl nuklease-freies Wasser
- 5 µl Kanamycin Positive Control RNA ($7,5 \times 10^3$ Kopien/µl)

Die Ansätze erfolgten in Form eines Mastermixes. Für die Negativkontrolle wurde statt RNA mit 1 µl nuklease-freiem Wasser auf 25 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Als Primer wurden die schon in den anderen PCR-Reaktionen verwendeten Primer für Beta-Aktin benutzt, wobei diesmal eine spezielle Fluoreszenzmarkierung des Vorwärtsprimers (siehe Tabelle 1) mit 5-Me-iso-dC stattgefunden hatte. Der rückwärts gerichtete Primer wurde unmarkiert verwendet. Pro Person und Zeitpunkt wurden beide isolierten RNA-Extrakte amplifiziert. Zur Standardisierung erfolgte die Mitführung einer Verdünnungsreihe einer Standard-RNA-Lösung oben genannter Konzentration von STRATAGENE.

Die PCR-Reaktion fand im Rotor-Gene 3000 von CORBETT LIFE SCIENCE statt und wurde unter folgenden PCR Bedingungen durchgeführt: Reverse Transkription bei 45 °C von fünf min Dauer, gefolgt von einem Zyklus initialer Denaturierung über zwei min bei 95 °C, anschließend 40 Zyklen mit den Schritten Denaturierung (fünf s bei 95 °C), Annealing und Extension (35 s bei 60 °C). Abschließend wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um erwünschte spezifische Produkte von unspezifischen Produkten unterscheiden zu können (Sherrill et al. 2004).

4.11.2 Analyse der Real-Time-PCR-Daten

Für die Auswertung wurden die durch die Rotor-Gene operating Software Version 6.0.23. berechneten Ct-Werte für Extrakt 1 und 2 je Proband verwendet, wobei absolut nur Proben des gleichen Laufes miteinander vergleichbar sind, da die Standardwerte nur für den jeweiligen Lauf gelten.

4.12 Statistische Analyse

Alle Daten wurden mit Microsoft Excel verarbeitet, wobei die geltenden Formeln zur Berechnung der Standardabweichung (STABW) und der Mittelwerte (MITTELWERT) verwendet wurden. Auch die Erstellung der Grafiken und Trendlinien erfolgte mit diesem Programm.

4.13 Verwendete Materialien

4.13.1 Chemikalien und Enzyme

Acrylamid		SERVA
Agarose		LIFE TECHNOLOGIES
Ammoniumacetat		MERCK
APS		SERVA
Aqua bidestillata	Ampuwa	FRESENIUS KABI
Bisacrylamid		SERVA
Borsäure		MERCK
Bromphenolblau		SERVA
Ethanol		MERCK
Formaldehyd		ROTH
Formamid deionisiert		SIGMA
Konzentrierte H ₂ SO ₄		SERVA
Konzentrierte HNO ₃		ROTH
Konzentrierte CH ₃ COOH		ROTH
100 Basenpaar-Leiter		GIBCO BRL
Magnesiumchlorid		ROTH
Natriumcarbonat		MERCK
Natriumchlorid		ROTH

Primer für Real-Time-PCR		EUROGENTEC S.A.
Reaktionsprimer für RT-PCR		QIAGEN
RNA-Standard		STRATAGENE
Septa für 0,5 ml Sample Tubes		APPLERA
Silbernitrat		ROTH
Standard	genRES LS 500 ROX	SERAC
	ILS 600	PROMEGA
TEMED		BIO-RAD
Tris		SERVA

4.13.2 Kits

AccessQuick™ RT-PCR System	PROMEGA
Big Dye™ Terminator Sequencing Kit (Version 1.1)	APPLIED BIOSYSTEMS
Plexor™ One-Step qRT-PCR System	PROMEGA
QIAquick™ PCR-Purification Kit	QIAGEN
SV Total RNA Isolation System	PROMEGA

4.13.3 Verbrauchsmaterialien

Aerosol geblockte	1.000 µl	nerbe plus
Pipettenspitzen	10 µl	Biozym
Filterpapierblättchen	Sample Application	SERVA
Gesichtsmasken	SurGINE II 4230	JOHNSON & JOHNSON
Handschuhe	Latex Sensi Clean	ANSELL MEDICAL LTD.
Klarsichtfolie		SARAN
Mikroreaktionsgefäße	Safe-Lock 1,5-2 ml	EPPENDORF
	GeneAmp 0,5 ml	APPLIED BIOSYSTEMS
	0,5 ml	APPLERA
Monovetten	K3 EDTA 9 ml	SARSTEDT
Pipettenspitzen	0,5-10 µl, 10-200 µl	EPPENDORF
	200-1.000 µl	M3P™ MOLECULAR BIO-PRODUCTS
Trägerfolien	Gel-Fix for PAGE	SERVA
	265 x 193 / 125 mm	

4.13.4 Geräte

Elektrophoresekammer	LKB Multiphor II	PHARMACIA BIOTECH
	Elektrophoresis	PHARMACIA BIOTECH
	Power Supply EPS	
	3500 XL	
Leuchtpult	LP 5000 K	HAMA
Mikrowellengerät	Micromat	AEG
PCR-Gerät	Thermocycler T3	BIOMETRA
Pipetten		EPPENDORF
Quarzküvette	Typ 4000 8454 'Z 15'	
Real-Time-PCR-Gerät	Rotor-Gene 3000	CORBETT LIFE SCIENCE
Sequenzier- und	ABI PRISM™ 310	APPLIED
Kapillarelektrophorese-	Genetic Analyzer	BIOSYSTEMS
Gerät		
Spektrophotometer	Gene quant pro	AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH
Thermoblock	TRIO Heated Lid	BIOMETRA
Vakuumzentrifuge	Speed Vak SPD 111V	SAVANT
Vortexer	Vortex-Genie II	SCIENTIFIC INDUSTRIES
Zentrifugen	Centrifuge 5810 R	EPPENDORF
	Centrifuge 5415 R	EPPENDORF

4.13.5 Verwendete Software

ABI PRISM™ Software Navigator™ Version 2.1	APPLIED BIOSYSTEMS
ABI PRISM™ Sequencing Analysis 3.0	APPLIED BIOSYSTEMS
ABI PRISM™ Gene Scan® 3.2.1	APPLIED BIOSYSTEMS
ABI PRISM™ Genotyper® Version 2.5	APPLIED BIOSYSTEMS
Generunner	HASTINGS SOFTWARE
Microsoft® Office Excel 2003	MICROSOFT
Rotor-Gene operating Software Version 6.0.23	CORBETT LIFE SCIENCE

5 Ergebnisse

5.1 Lagerung des Blutes

Bis auf Person 2, bei der die gewonnene Blutmenge nicht ausreichte, war es möglich, RNA aller Blutproben bis zu einer Lagerdauer von 178 Tagen zu extrahieren. Im Laufe der Lagerungszeit des Blutes in den Monovetten veränderte sich dessen Farbe und Konsistenz insofern, dass das Blut nach und nach immer dunkler (fast schwarz) wurde und sich der abgelagerte Leukozytenring (buffy coat) immer zäher verhielt. Auch die Menge übrig bleibenden Pellets nahm nach der Zentrifugation an Volumen zu.

5.2 Semiquantitative und quantitative Analyse

5.2.1 Fragmentlängenanalyse

5.2.1.1 Ergebnisse der Vorversuche

Im Polyacrylamid-Gel stellten sich für jedes amplifizierte Fragment distinkte Banden im Bereich der erwarteten Produktlänge dar (Abbildung 4). Durch die Erhöhung der Zyklenzahl auf bis zu 35 Zyklen verstärkte sich bei allen amplifizierten mRNA-Abschnitten die Bandenintensität. Eine weitergehende Steigerung auf 40 PCR-Zyklen erbrachte keinen nennenswerten zusätzlichen Unterschied.

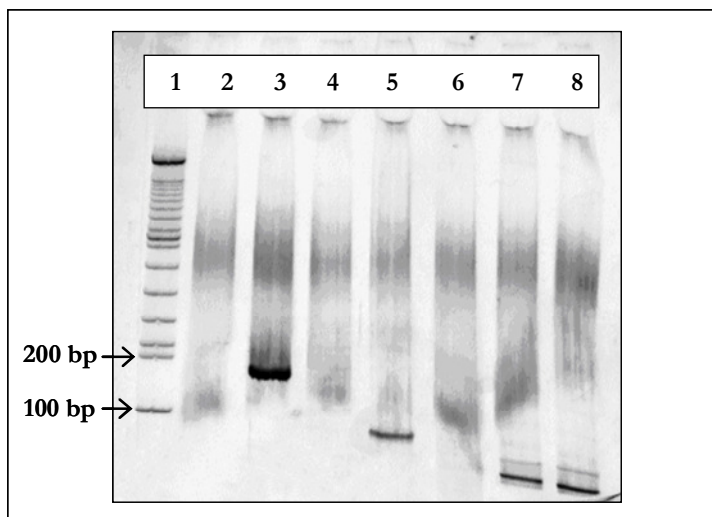


Abbildung 4: Darstellung der Produktbanden der verschiedenen Fragmente:

Das PCR-Produkt des Beta-Aktin-Fragmentes mit einer Länge von 179 bp (3) weist die intensivste Bande im Vergleich zu den Proben von Interleukin-1-Beta (5) mit einer Länge von 87 bp und dem mit 76 bp kürzesten Fragment GAPDH (7 und 8) auf. Die dazugehörigen Leerwerte werden in den Reihen 2, 4 und 6 veranschaulicht.

5.2.1.1.1 Interleukin-1-Beta

Durch veränderte Amplifikationsbedingungen, ausgehend von den Empfehlungen von BRINK (Brink et al. 2000), aus dessen Arbeit die Primer übernommen worden waren, ergaben sich keine wesentlichen Verbesserungen der Darstellung der Produktbande. Bei Verwendung der PCR-Bedingungen, die für das Beta-Aktin-Fragment genutzt wurden und deren Varianten, stellte sich die Bandenintensität durch die Erhöhung der Annealingtemperatur auf 66 °C, die Verlängerung der Annealingzeit auf 90 s und der Synthesezeit auf 60 s am besten dar. Bei den Verdünnungsuntersuchungen resultierten stetig abnehmende Bandenintensitäten im PAA-Gel. Bei vier von sechs Proben konnten bis zu einer Ausgangsmenge von 18 pg RNA noch deutliche Produktbanden dargestellt werden. Die Amplifikate konnten dabei bis zu 1541 rfu detektiert werden, so dass eine noch geringere Nachweisgrenze anzunehmen ist.

5.2.1.1.2 GAPDH

Ähnlich wie beim mRNA-Abschnitt von Interleukin-1-Beta war auch bei GAPDH eine gesteigerte Intensität der Produktbande bei 35, jedoch nicht bei 40 PCR-Zyklen feststellbar. Alle anderen getesteten Bedingungen führten zu keiner Verbesserung. Die Senkung der Annealingtemperatur ging mit der Bildung multipler unspezifischer Banden einher.

Die verschiedenen RNA-Extrakte waren zum Großteil bis zu einer Ausgangsmenge von 180 pg mit Hilfe des PAA-Gels nachweisbar. Eine Probe zeigte bei 18 pg noch eine eindeutige Produktbande, die auch mittels Fragmentlängenanalyse nachgewiesen werden konnte.

5.2.1.1.3 Beta-Aktin

Beim Vergleich der Bandenintensität im Gel zeigte sich, dass eine finale Primerkonzentration von 0,5 µM ein sehr gutes Ergebnis erbrachte, welches durch die Verwendung der doppelten Menge kaum zu verbessern war (siehe Abbildung 5). Die Reduktion des Gesamtansatzvolumens auf die Hälfte veränderte die Menge an Amplifikat nicht.

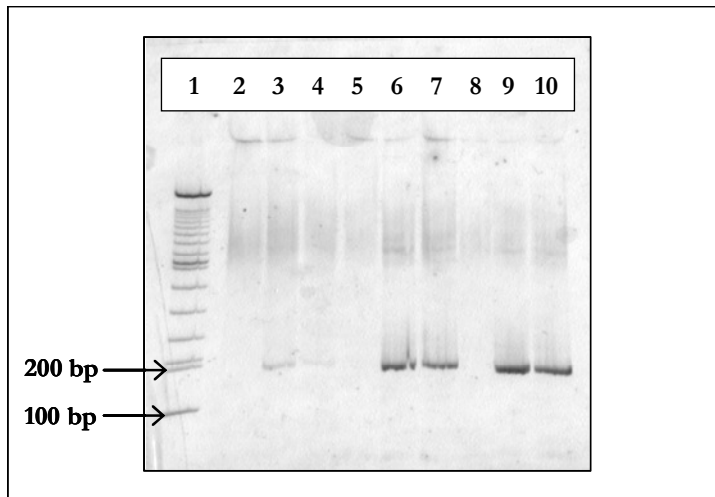


Abbildung 5: PAA-Gel von Beta-Aktin mit Variation der Primermenge:

Im dargestellten Ausschnitt eines PAA-Geles wurden Leerwerte und jeweils zwei Proben der Amplifikation von Beta-Aktin mit unterschiedlichen Mengen an Primern aufgetragen. Neben dem dargestellten Längenstandard (1) und den Leerwerten für die jeweilige Primerkonzentration (2, 5, 8) resultierten schwache Produktbanden bei einer Primerkonzentration von $0,1 \mu\text{M}$ für beide Proben (3 und 4), wobei der Unterschied einer finalen Primerkonzentration zwischen $0,5 \mu\text{M}$ (Banden in 6 und 7) und $1 \mu\text{M}$ (9 und 10) bei beiden verwendeten Proben eher gering ist.

Eine stetige Verringerung der Intensität der Produktbande mit steigender Verdünnung war für alle verwendeten Proben darstellbar. Sichtbare Banden für Beta-Aktin im PAA-Gel und eindeutige Peaks bis 428 rfu bei der Auswertung der Fragmentlängenanalyse konnten bis zu einer eingesetzten RNA-Menge von minimal $1,8 \text{ fg}$ erbracht werden. Es ist somit möglich, dass sogar noch geringere RNA-Mengen nachweisbar sein könnten.

Bezugsmaß hinsichtlich eingetretener Degradation der Template-RNA und Grundlage der Quantifizierung der amplifizierten Fragmente war der Peakflächeninhalt in relativen Fluoreszenzeinheiten. Die Untersuchung der Proben mit einer Lagerdauer von 35 Tagen und mehr diente im Wesentlichen zur Überprüfung, wie lange RNA noch mit den verwendeten Systemen nachweis- beziehungsweise amplifizierbar ist. Die gemessenen Werte wurden daher nicht für die Auswertung zur Einordnung in Zeitintervalle einbezogen. Die maximal untersuchte Lagerungsdauer für die Fragmentlängenanalyse betrug 123 Tage. Für jede Person wurde die Auswertung der Einzelmesswerte vorgenommen, wobei es sich als günstig erwies, diese zusätzlich in Zeitintervalle zu gruppieren. Hierbei wurden für die einzelnen Gruppen Mittelwerte gebildet und die Standardabweichung errechnet, sofern mehrere Einzelmesswerte im Intervall vorlagen.

5.2.1.2 Analyse der PCR-Produkte von Interleukin-1-Beta

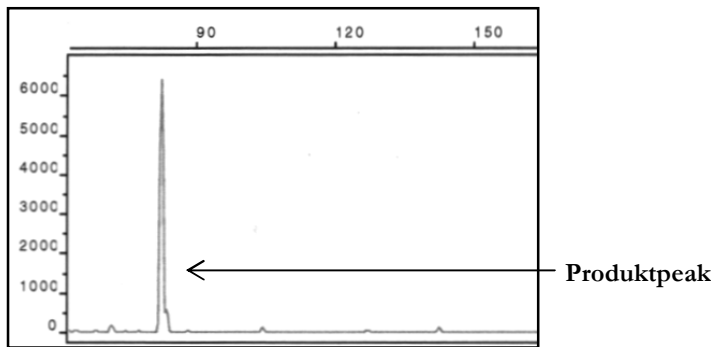


Abbildung 6: Produktpeak des amplifizierten Fragmentes von Interleukin-1-Beta am Beispiel von Person 5 direkt nach der Blutabnahme.

Für den amplifizierten RNA-Abschnitt von Interleukin-1-Beta zeigte sich bei der Fragmentlängenanalyse ein eindeutiger Peak im erwarteten Längenbereich (Abbildung 6).

Für Interleukin-1-Beta waren bei Proben mit einer Lagerungsdauer von mehr als zwölf Tagen keine spezifischen Amplifikate mehr nachweisbar. Eine Übersicht über alle erhobenen Peakflächeninhalte liefert Tabelle 2 des Anhangs. Die grafische Übersichtsdarstellung der Ergebnisse der Fragmentlängenanalyse findet sich in Abbildung 7.

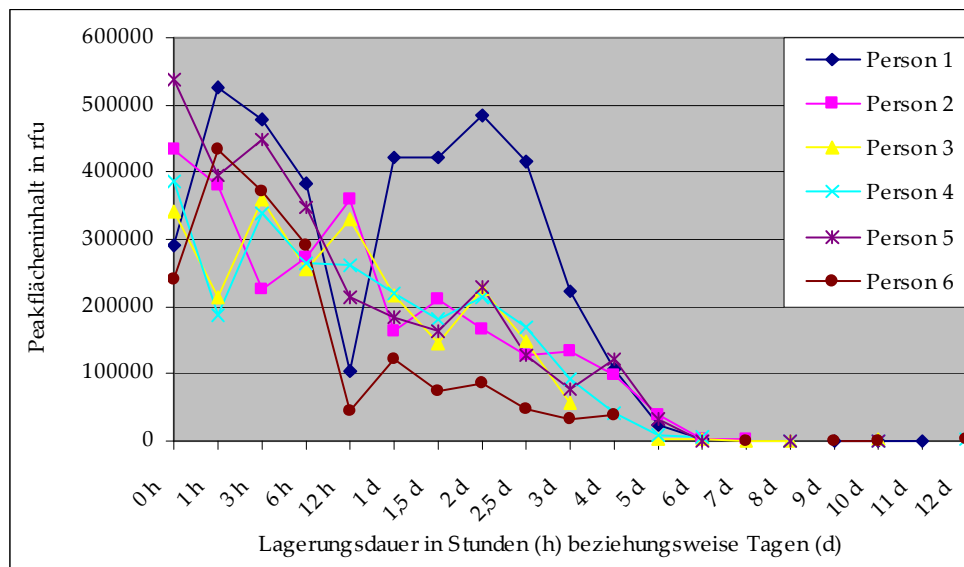


Abbildung 7: Darstellung der Peakflächeninhalte jeder Person für Interleukin-1-Beta. Aufgetragen sind die erhobenen Peakflächeninhalte in rfu gegenüber der Lagerdauer des Blutes auf einer nicht realistischen Zeitachse.

In diesem System folgt nun die Einzeldarstellung pro Person und die Gruppierung in Intervalle zu je drei Tagen.

Die Werte von Person 1 lassen erkennen, dass es sehr rasch zum Geringwerden der Peakflächeninhalte aufgrund zunehmender Degradation der Template-RNA kommt, wodurch die feststellbaren Veränderungen schon nach einer Lagerdauer von sechs Tagen sehr gering sind

(Abbildung 8a). RNA war bis zu einer Lagerdauer von elf Tagen amplifizierbar. Der 12-Stunden-Wert weicht stark nach unten ab, alle anderen Werte bis zum Zeitpunkt 2,5 Tage unterscheiden sich erheblich von den Werten ab Tag 3, was in der gruppierten Darstellung von Abbildung 9a verdeutlicht wird. Nach einer Lagerungsdauer von zwei Tagen nahm die Amplifikatmenge stetig ab. Unter Berücksichtigung der Standardabweichung, die allerdings für das Intervall von 6 bis 8 Tagen durch das Vorhandensein von nur einem Wert nicht berechnet werden konnte, liegt keine Überlappung der verschiedenen Bereiche vor.

Die Messwerte für Person 2 (Abbildung 8b) zeigen ihr Maximum direkt nach der Blutentnahme und ihr Minimum bei Tag 6. Die Schwankung der Peakflächeninhalte ist zu Beginn am höchsten, glättet sich nach einer Lagerdauer von anderthalb Tagen aber zunehmend. Die gewählte RNA-Sequenz konnte bis zu einer Lagerdauer von sieben Tagen detektiert werden. Schon nach einem Tag liegen die Werte deutlich niedriger als zuvor und fallen danach langsamer ab. Die Gruppierung der Werte ist in Abbildung 9b veranschaulicht und zeigt sich nicht überlappende Bereiche der Standardabweichung vom Mittelwert.

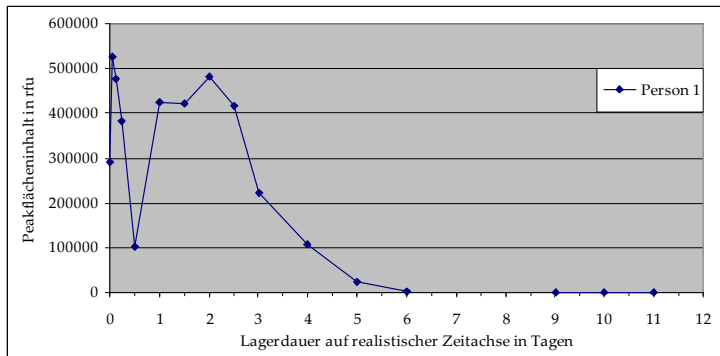
Die PCR-Produkte von Person 3 waren bis zu einer Lagerdauer von zehn Tagen mit der angewandten Methode nachweisbar. Es ist zu sehen, dass die anfänglichen Peakflächeninhalte in engen Zeiträumen schwanken, wobei eine deutliche Verringerung der Anfangswerte schon nach einem Tag erkennbar ist (Abbildung 8c). Die Verringerung der Menge amplifizierbarer RNA geht sehr schnell und schon nach fünf Tagen verändern sich die Peakflächeninhalte nur noch wenig. Die Werte bis zu einer Lagerdauer von zweieinhalb Tagen liegen deutlich höher als für längere Zeiträume. Die Gruppierung in die Intervalle zu drei Tagen (Abbildung 9c) zeigt, dass sich deren Mittelwerte stark unterscheiden, so dass eine Abgrenzbarkeit vom ersten zum zweiten Intervall gegeben ist.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse für Person 4 fällt auf, dass die Werte vom Maximum, dem zeitnah zur Blutabnahme gelegenen Extraktionszeitpunkt, zum Minimum nach acht Tagen abnehmen. Der Peakflächeninhalt von einer Stunde weicht zu nach unten (geringere Höhe) und der Wert von zwei Tagen nach oben von den anderen ab. Die Verringerung der Peakflächeninhalte erfolgt anfangs schneller, geht ab Tag 3 in eine deutliche flachere Kurve über und ist danach nur noch sehr gering, wie in Abbildung 8d sichtbar ist. Die Peakflächeninhalte bis zu einer Lagerdauer von zweieinhalb Tagen befinden sich alle oberhalb von 150.000 rfu, alle folgenden Werte liegen unterhalb davon. Damit gelingt eine Abgrenzung der Lagerintervalle für die Gruppe von 0 bis 2 Tagen gegenüber der von 3 bis 5 Tagen ohne sich überlappende Bereiche der Standardabweichung (siehe Abbildung 9d). Aufgrund der weiterhin starken Degradation zwischen Tag 3 und Tag 5 ergibt sich eine hohe Standardabweichung, die keine weitere

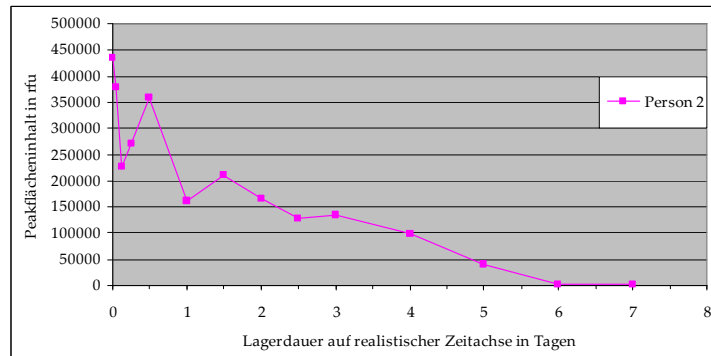
Unterscheidung der noch später liegenden Intervalle erlaubt.

Auch bei Person 5 fällt eine starke Verminderung der detektierten Peakflächeninhalte bis zu einer Lagerdauer von zwölf Stunden auf, danach sinken die Werte langsamer. Zu den Zeitpunkten 7 und 9 Tage war kein Produktpeak messbar, der letzte Nachweis gelang nach einer Alterung der Probe von zehn Tagen (Abbildung 8e). Wenn die erhobenen Daten wie in Abbildung 9e zu drei Tagen gruppiert dargestellt werden, zeigt sich eine Verringerung des Mittelwertes von Intervall eins zum nächsten um mehr als zwei Drittel. Die Bereiche der Standardabweichung überlappen nicht, jedoch liegen die Werte von zweieinhalb und vier Tagen nur wenig auseinander. Der Mittelwert für das letzte Intervall von 9 bis 11 Tagen ist geringfügig höher als für das vorhergehende.

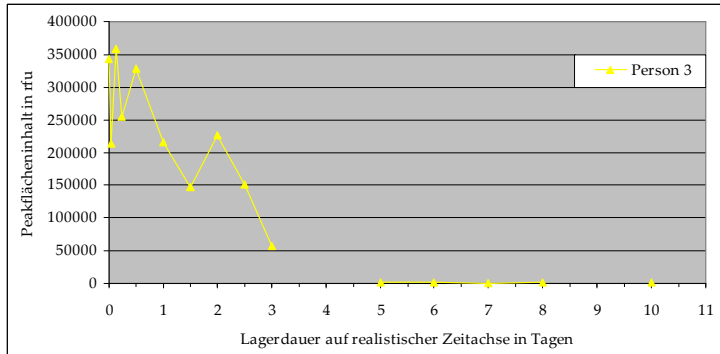
Die letzte Person ähnelt Person 5 dahingehend, dass auch bei Person 6, die in Abbildung 8f erfasst ist, ein rascher Abfall der relativen Fluoreszenzeinheiten schon nach weniger als einem halben Tag zu erkennen ist. Ab einer Lagerdauer von zwölf Stunden ist dieser Verlauf weniger steil. Der erste Messwert liegt deutlich niedriger als die darauf folgenden mit Lagerdauern von einer, drei und sechs Stunden. Die breite Standardabweichung der ersten Gruppe wird durch einen niedrigen Wert von zwölf Stunden bedingt, wodurch sich dennoch keine Überlappung mit dem zweiten Intervall ausbildet (Abbildung 9f). Insgesamt ließ sich das Fragment bis zu einer Lagerdauer des Blutes von zwölf Tagen nachweisen, wobei dieser letzte Wert höher als der der Tage sieben, neun und zehn war.



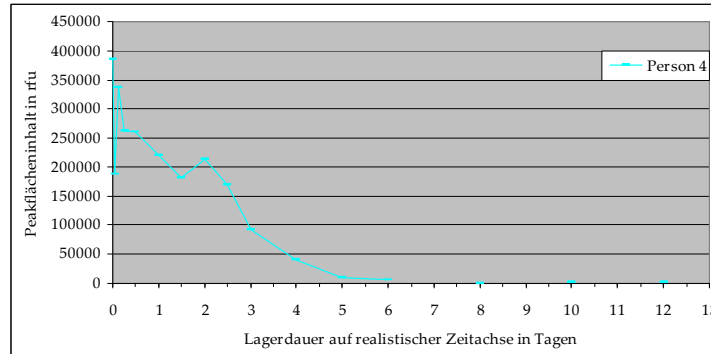
a) Person 1



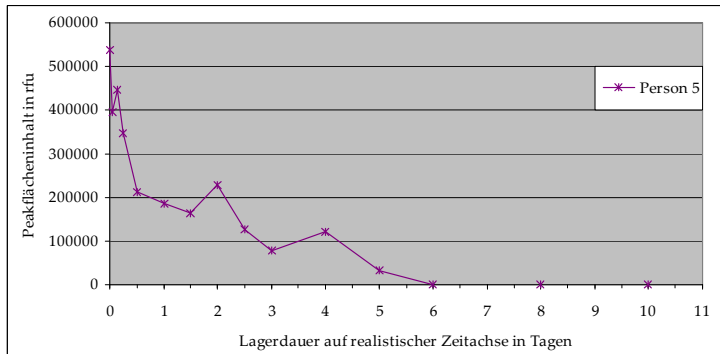
b) Person 2



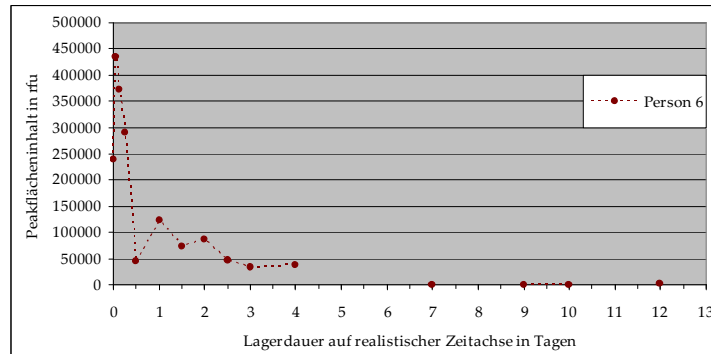
c) Person 3



d) Person 4



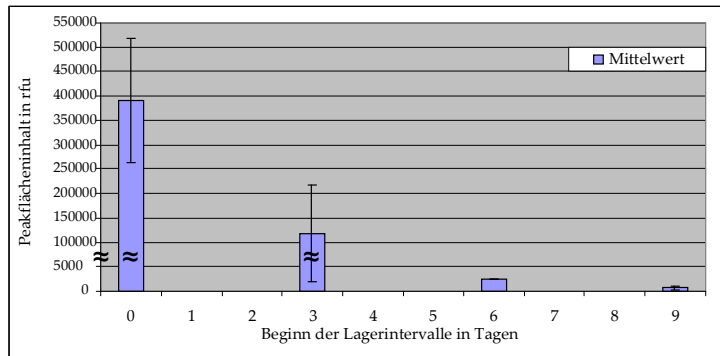
e) Person 5



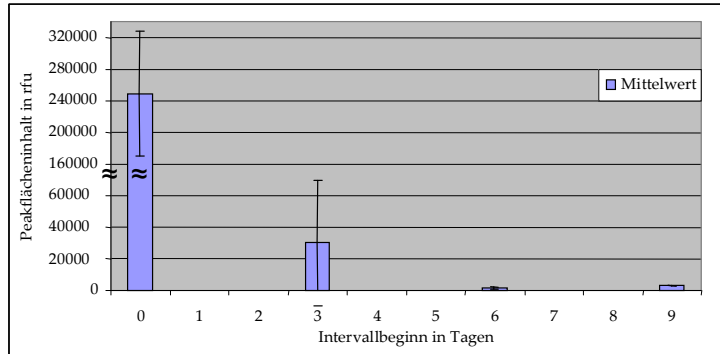
f) Person 6

Abbildung 8:

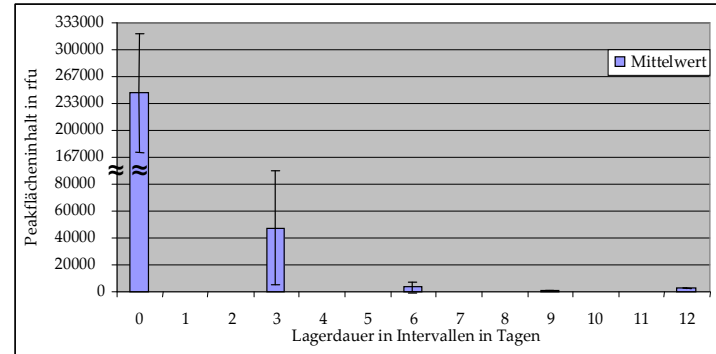
Darstellung der erhobenen Peakflächeninhalte in rfu zu den verschiedenen Zeitpunkten der Lagerdauer. Die einzeln dargestellten Verläufe der Peakflächeninhalte der sechs Probanden (a-f) weisen einen ähnlichen Verlauf auf, wobei maximal bis zu einer Lagerdauer von zwölf Tagen ein Amplifikat nachweisbar war.



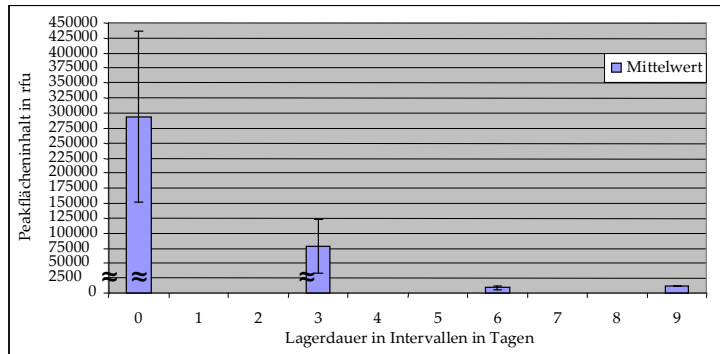
a) Person 1



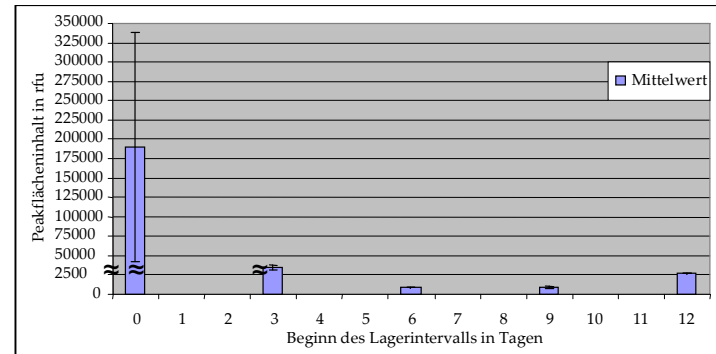
b) Person 2



c) Person 3



d) Person 4



e) Person 5

f) Person 6

Abbildung 9:

Gruppierte Darstellung der Interleukin-1-Beta Peakflächeninhalte für die einzelnen Personen (a-f) anhand der Mittelwerte mit einer Standardabweichung. Die y-Achse bezeichnet den Beginn der einzelnen 3-Tages-Intervalle.

5.2.1.3 Ergebnisse der Analyse des GAPDH-Fragmentes

Die kapillarelektrophoretische Fragmentlängenanalyse des RNA-Templates von GAPDH ergab einen eindeutigen Peak im erwarteten Längenbereich mit kleinem Splitpeak (Abbildung 10).

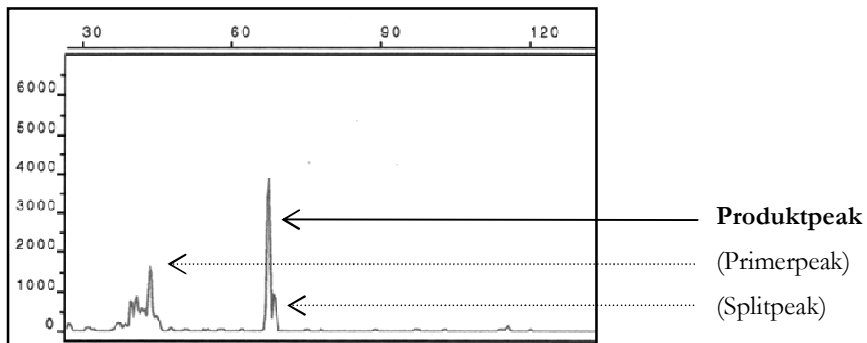


Abbildung 10: Darstellung des Peaks der PCR-Produkte von GAPDH am Beispiel von Person 4 nach einer Lagerdauer von zwei Tagen.

Auch bei der Quantifizierung der PCR-Produkte von GAPDH fällt eine rasche Abnahme der Peakflächeninhalte auf. Die Nachweisbarkeit war bis zum letzten hierfür untersuchten Zeitpunkt von 123 Tagen für alle Probanden bei noch vorhandenem Material gegeben (Abbildung 11). Einzelne Werte können Tabelle 4 im Anhang entnommen werden.

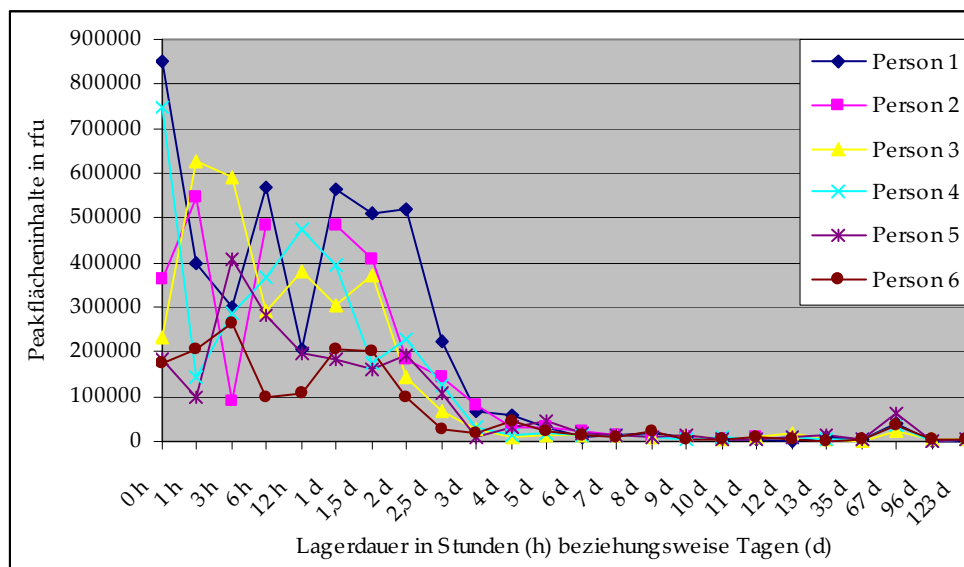


Abbildung 11: Überblick über die Peakflächeninhalte der sechs Personen im System GAPDH bis zu einer Lagerdauer von 123 Tagen auf einer nicht realistischen Zeitachse.

Die Verteilung der Messwerte, wie in den Abbildungen 11 und 12 a zu sehen, zeigt wiederum, dass sich die Werte bis zu einer Lagerdauer von 2,5 Tagen deutlich von denen danach unterscheiden. Die Gruppierungsdarstellung (Abbildung 13a) bestätigt dies anhand der großen Veränderung der Mittelwerte vom erstem zum zweitem Intervall. Sie zeigt, mit Ausnahme der

letzten beiden Intervalle untereinander, keine Überlappungsbereiche zwischen den einzelnen Gruppen.

Die Darstellung der Einzelmesswerte in Abbildung 12b für Person 2 illustriert bis auf den stark abweichenden Wert bei einer Lagerdauer von drei Stunden, dass die Peakflächeneinheiten vor Tag 2 höher liegen als danach und außerdem, dass es eine weitere rasche Degradation bis Tag 4, danach eine geringere tägliche Abnahme sowie ab Tag 7 nur noch dezente Veränderungen gibt. Die Gruppierung der Werte in Abbildung 13b zeigt eine sehr starke Reduktion des Mittelwertes von Intervall eins zu zwei und einen großen Abstand der Bereiche der Standardabweichung dieser beiden Intervalle. Alle anderen Bereiche liegen enger, lassen sich aber trotzdem gut voneinander abgrenzen.

Person 3 zeigt in Abbildung 12c hohe Anfangswerte mit erheblichen Schwankungen, jedoch eine nahezu stetige und sehr schnelle RNA-Degradation ab einer Lagerungszeit von anderthalb Tagen. Die Peakflächeninhalte nach einer Lagerdauer von zwölf und 67 Tagen weichen leicht nach oben ab.

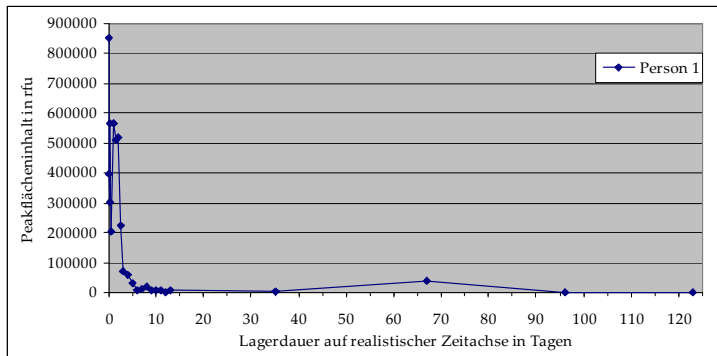
Abbildung 13c zeigt eine deutliche Abgrenzung der Werte der Proben, die weniger als drei Tage alterten. Die anderen Mittelwerte sind viel kleiner und die Standardabweichungen überlappen sich, so dass keine eindeutigen Unterschiede zwischen den Gruppen mehr fassbar sind.

Die Darstellung der Einzelmesswerte für Person 4 im System GAPDH wird in Abbildung 12d veranschaulicht. Es zeigt sich ein deutlicher Unterschied der Peakflächeninhalte der Proben, die weniger als anderthalb Tage alterten, wobei der Wert von einer Stunde stark nach unten abweicht. Auch die Werte von drei und sechs Stunden Lagerdauer weichen im Vergleich zu den nachfolgenden zu geringeren Peakflächeninhalten hin ab. Nach mehr als zwölf Stunden folgt eine recht gleichmäßige Verminderung der detektierten Peakflächeninhalte. Der Wert von 67 Tagen weicht deutlich nach oben ab, der von zwölf Tagen Lagerdauer nur leicht. Bei der gruppierten Darstellung der Peakflächeninhalte für Person 4 in Abbildung 13d wird gezeigt, dass ein erheblicher Unterschied zwischen den Messwerten bis zu einer Lagerdauer von drei Tagen und denen danach besteht. Trotz der breiten Standardabweichung ist eine Abgrenzung zwischen erstem und zweitem Intervall möglich. Intervall zwei und drei zeigen überlappende Standardabweichungen, Intervall drei und vier sind klar voneinander abgrenzbar. Wiederum ist keine Abgrenzbarkeit zwischen Intervall vier und fünf gegeben, deren Mittelwerte sehr nah beieinander liegen.

In der Grafik Abbildung 12e mit den zugrunde liegenden Daten für Person 5 ist zu erkennen, dass es ein nahezu stetiges Geringerwerden der Peakflächeninhalte ab einer Lagerdauer von drei Stunden zu verzeichnen gibt. Der Anfangswert und der darauf folgende (null beziehungsweise

eine Stunde Lagerdauer) weichen von diesem Verlauf erheblich nach unten ab. Auch der Wert von drei und vier Tagen Lagerdauer scheint verhältnismäßig niedrig zu sein. Der Wert vom Lagertag 67 weicht zu größeren Peakflächeninhalten hin ab. In Abbildung 13e ist eine deutliche Abgrenzbarkeit der Peakflächeninhalte der gealterten Proben bis zu einer Lagerdauer von drei Tagen von denen mit längerer Alterung gegeben. Alle anderen Intervalle lassen sich untereinander nicht eindeutig abgrenzen. Der Mittelwert des Intervalls mit einer Lagerdauer von 12 bis 13 Tagen ist sogar höher als der des unmittelbar vorangegangenen Intervalls, wobei alle vorherigen Mittelwerte eine Verringerung im zeitlichen Ablauf zeigten.

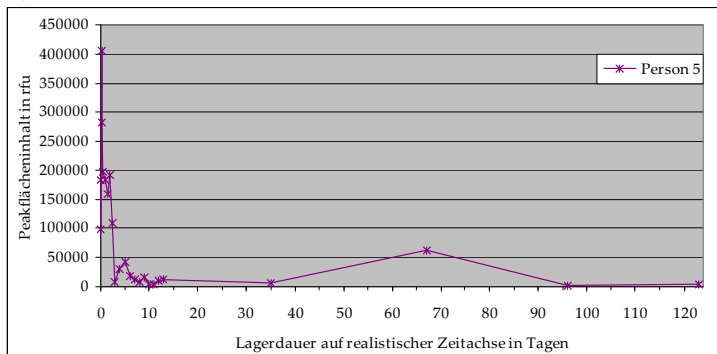
Auch bei Person 6 (Abbildung 12f) gab es schwankende Werte für die bestimmten Peakflächeninhalte vor allem im Anfangsbereich. Eine zu Beginn sehr starke und später flacher verlaufende Kurve der Peakflächeninhalte bei einer Lagerdauer von 24 Stunden bis zu 13 Tagen ist zu erkennen. Wiederum weicht der Wert von 67 Stunden nach oben hin ab, wie es auch bei den anderen bis zu diesem Zeitpunkt untersuchten Proben auffiel. Eine gruppierte Darstellung der Werte wurde in Abbildung 13f vorgenommen. Auch bei Person 6 scheint hier eine Differenzierung zwischen Proben, die bis zu drei Tagen alterten und länger gelagerten möglich. Eine sichere Unterscheidung von Proben im Intervall zwei ist im Vergleich zu Proben aus Intervall drei nicht möglich, jedoch im Vergleich zu Intervall vier und fünf gegeben. Die neun bis elf Tage gelagerten Proben lassen sich von älteren abgrenzen. Insgesamt ist eine stetige, deutliche Abnahme der Mittelwerte von Intervall zu Intervall zu verzeichnen.



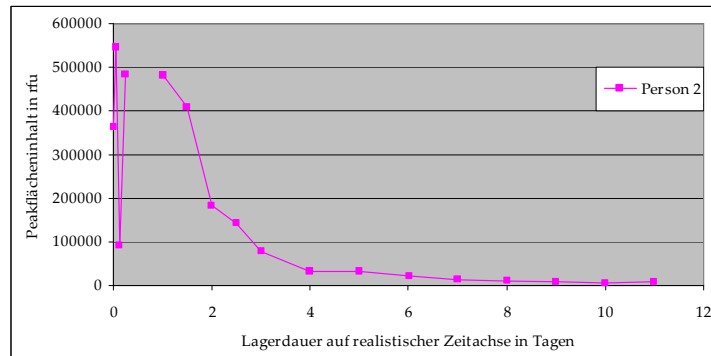
a) Person 1



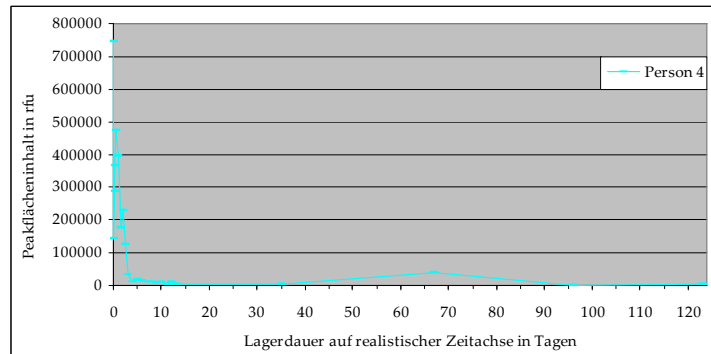
c) Person 3



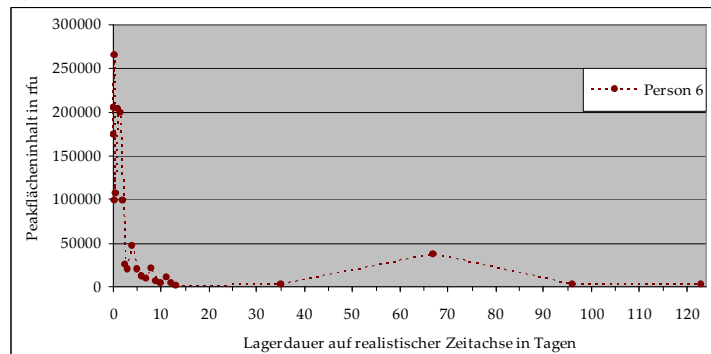
e) Person 5



b) Person 2



d) Person 4

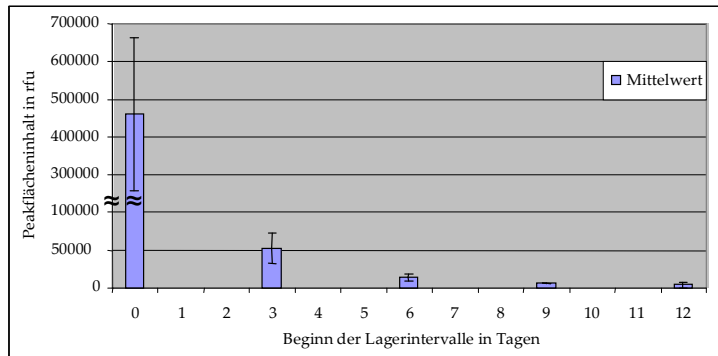


f) Person 6

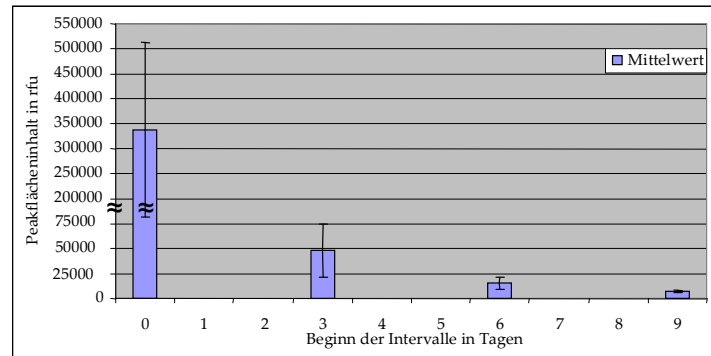
Abbildung 12:

Darstellung der erhobenen Peakflächeninhalte je Proband (a-f) in rfu zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten der gesamten Lagerdauer für den amplifizierten Abschnitt der GAPDH-mRNA.

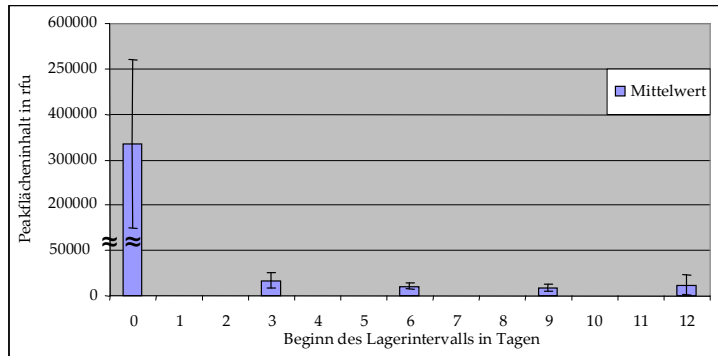
Die PCR gelang bis zum letzten für diese mRNA untersuchten Zeitpunkt nach einer Lagerdauer von 123 Tagen.



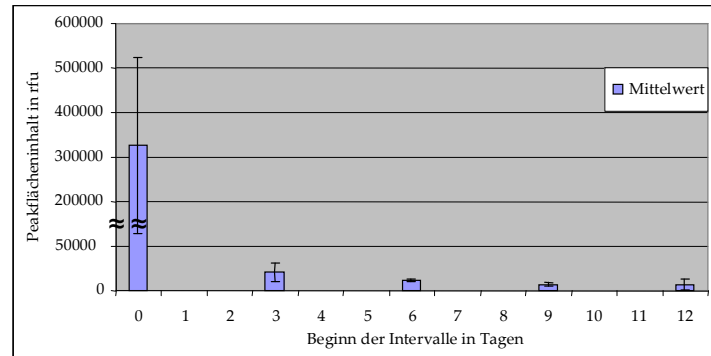
a) Person 1



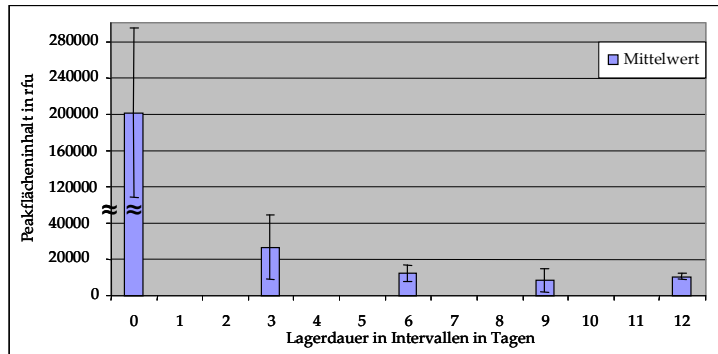
b) Person 2



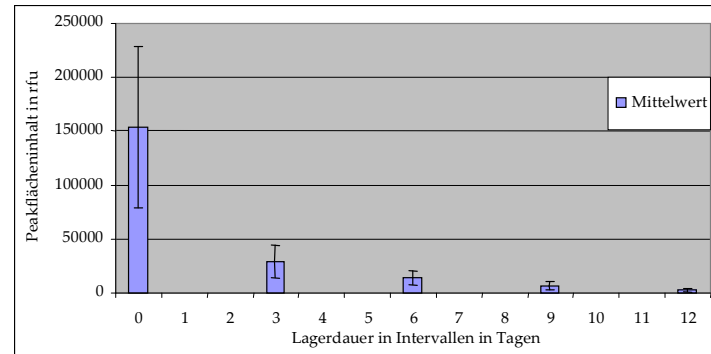
c) Person 3



d) Person 4



e) Person 5



f) Person 6

Abbildung 13:

Gruppierte Darstellung der Peakflächeninhalte des amplifizierten GAPDH-Abschnittes für die einzelnen Personen (a-f) anhand der Mittelwerte mit einer Standardabweichung. Die y-Achse bezeichnet den Beginn der einzelnen 3-Tages-Intervalle.

5.2.1.4 Analyse des Beta-Aktin-Fragmentes

Die Amplifikation von Beta-Aktin lieferte einen klaren Peak im Bereich der erwarteten Fragmentlänge. Die Abbildung 14 mit den Einzelgrafiken a bis c illustriert die sichtbare Veränderung der Peakhöhe in Abhängigkeit von der Lagerdauer.

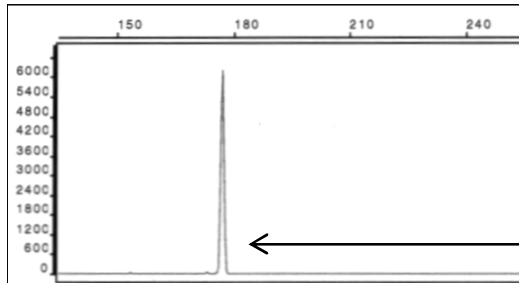


Abbildung 14a)
Beta-Aktin-Peak für Person 4
zum Zeitpunkt 0 (Verdünnung 1:10)

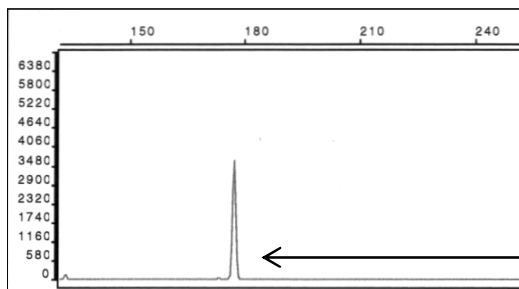


Abbildung 14b)
Beta-Aktin-Peak für Person 4
zum Zeitpunkt 5d (Verdünnung 1:5)

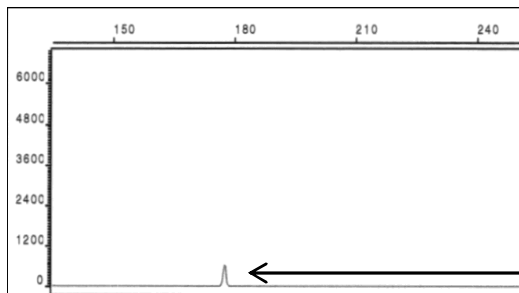


Abbildung 14c)
Beta-Aktin-Peak für Person 4
zum Zeitpunkt 10d (Verdünnung 1:5)

Abbildung 14: Darstellung des Produktpeaks des Beta-Aktin-Fragmentes für Person 4 zu verschiedenen Zeitpunkten mit sukzessiver Verminderung der Peakhöhe und –fläche.

Abbildung 15 stellt eine orientierende Übersicht aller erhobenen Peakflächeninhalte der sechs Personen für Beta-Aktin dar. Die dazugehörigen Daten finden sich tabellarisch im Anhang (Tabelle 5).

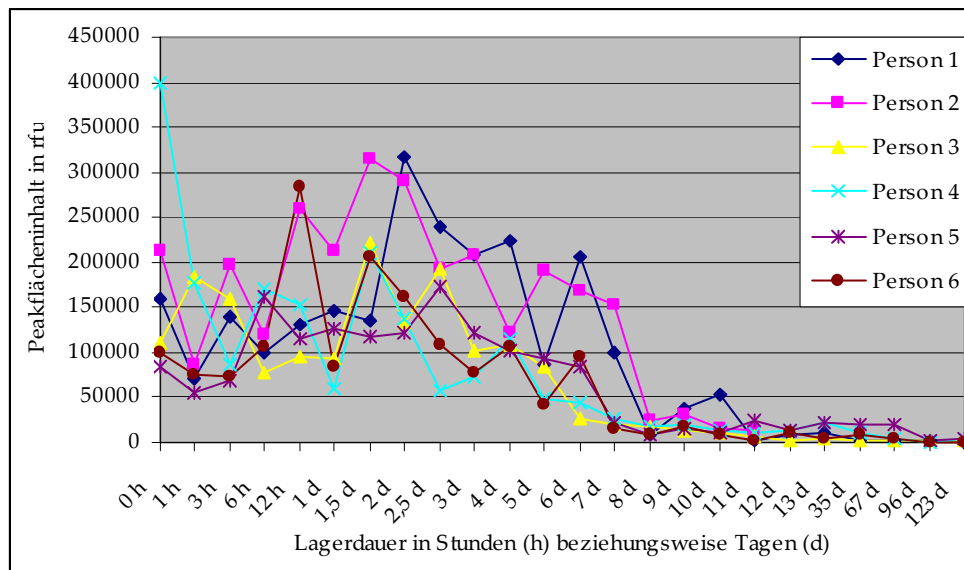


Abbildung 15: Darstellung der Daten aller Probanden für die Amplifikation von Beta-Aktin auf einer nicht realistischen Zeitachse.

Die realistische zeitliche Darstellung der Ergebnisse der einzelnen Peakflächeninhalte bis zu einem Probenalter von 35 Tagen wird für alle Personen in Abbildung 16 vorgenommen. Es ist zu sehen, dass eine sichtliche Verringerung der Peakflächeninhalte vom Beginn der Lagerdauer an stattfindet. Die einzelnen Werte schwanken dabei und die Verringerung ist nicht stetig. Es fällt auf, dass die Werte des weniger als anderthalb Tage lang gelagerten Blutes bei einigen Probanden geringer sind als danach.

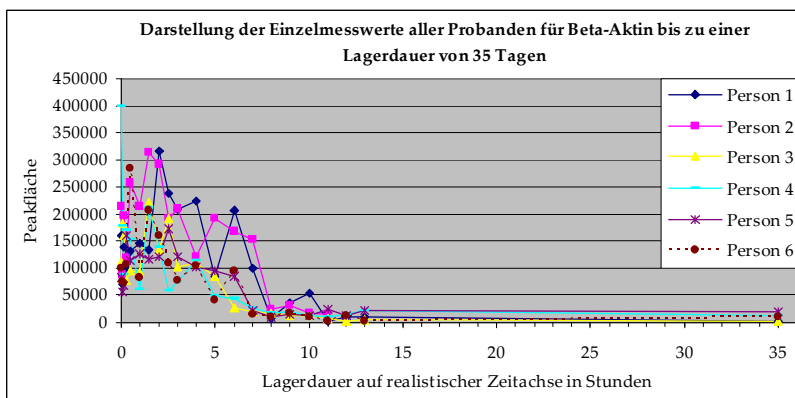


Abbildung 16: Darstellung der Einzelmesswerte aller Personen im zeitlichen Verlauf bis zu einer Lagerdauer von 35 Tagen.

Im Folgenden werden für jede untersuchte Person die einzelnen Peakflächeninhalte im System Beta-Aktin und die Gruppierung dieser Werte in 3-Tages-Intervallen vorgestellt.

Die Werte von Person 1 zeigen eine deutliche Veränderung im Laufe der Lagerungszeit. Der Nachweis der RNA gelang bis zum letzten für Beta-Aktin mittels Fragmentlängenanalyse untersuchten Zeitpunkt von 123 Tagen. Die Messwerte der Extraktionszeitpunkte null bis

anderthalb Tage weisen nur geringe Unterschiede auf und liegen weitaus niedriger als die darauf folgenden Werte ab einer Lagerdauer von zwei Tagen (Abbildung 17a). Von diesem Spitzenwert an sind deutlich geringere Peakflächeninhalte zu verzeichnen. Ihre weitere Veränderung nach einer Lagerdauer von 13 Tagen ist sehr gering. Bei Betrachtung der Ergebnisse fällt auf, dass sich die Werte trotz der vorhandenen Schwankungen in Gruppen zusammenfinden, wie Abbildung 18a zeigt. Die Überlappung der Intervalle bei Berücksichtigung der Standardabweichung ist jedoch hoch.

Die gemessenen Peakflächeninhalte für Person 2 werden in Abbildung 17b veranschaulicht. Ähnlich wie bei Person 1 liegen die Werte von Zeitpunkt 0 bis Tag 1 der Lagerdauer auch hier niedriger als die Spitzenwerte bei anderthalb und zwei Tagen. Die Werte schwanken stark. Eine klar erkennbare Veränderung wird im Übergang von Tag 7 auf 8 deutlich. Die Werte befinden sich in sichtbar geringeren Bereichen unter 50.000 relativen Fluoreszenzeinheiten und verändern sich nur wenig. Die Darstellung der zu Intervallen zusammen gefassten Peakflächeninhalte in Abbildung 18b zeigt eine stetige Abnahme der Mittelwerte, die sich mit zunehmender Lagerdauer von Intervall zu Intervall erhöht. Die Bereiche der Standardabweichung überlappen sich für die ersten drei Intervalle.

In Abbildung 17c werden die gemessenen Werte für Person 3 im System Beta-Aktin dargestellt. Die Peakflächeninhalte bis zu einer Lagerdauer von zweieinhalb Tagen schwanken stark, die Werte von drei bis fünf Tagen liegen nah beieinander um 100.000 rfu. Danach erfolgen eine starke Degradation und eine weitere Abnahme der Peakflächeninhalte auf 3.798 rfu bis zum Tag 13. Die noch folgenden Messwerte liegen unterhalb davon und verändern sich nur noch geringfügig.

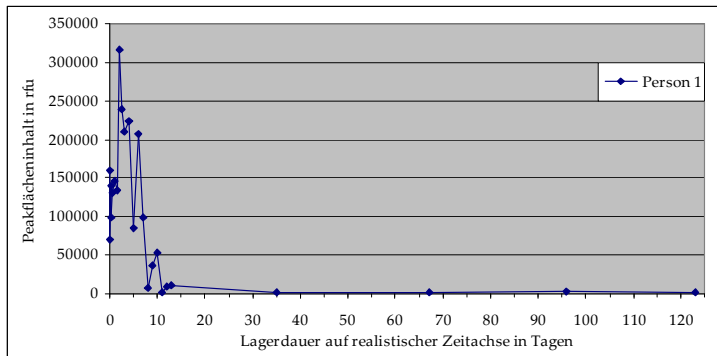
Wenn die Daten für Person 3 gruppiert dargestellt werden (Abbildung 18c), resultiert die starke Schwankung der zu Beginn erhobenen Messwerte in einer weiten Standardabweichung, die mit dem zweiten Intervall von 3 bis 5 Tagen überlappt und deshalb keine eindeutige Zuordnung der zu verschiedenen Zeiten verarbeiteten Proben erlaubt. Beide Intervalle unterscheiden sich jedoch erheblich von den anderen Gruppen. Die Mittelwerte der letzten drei Intervalle grenzen sich deutlich voneinander ab und schließen nicht die gleichen Bereiche der Standardabweichung ein.

In der folgenden Abbildung 17d sind die Peakflächeninhalte für Proband 4 veranschaulicht. Vor allem in der kleineren Darstellung der frühen Daten erkennt man, dass bis auf den Wert direkt nach der Blutabnahme alle anderen Werte bis zu einer Lagerdauer von anderthalb Tagen dadurch auffallen, dass sie eher klein sind. Nach diesem Wert findet ein erneutes Geringerwerden der Peakflächeninhalte statt, wobei der Wert von vier Tagen nach oben abweicht. Bei einer Lagerdauer von 12 und 13 Tagen ist wiederum ein geringfügig höherer Peakflächeninhalt zu

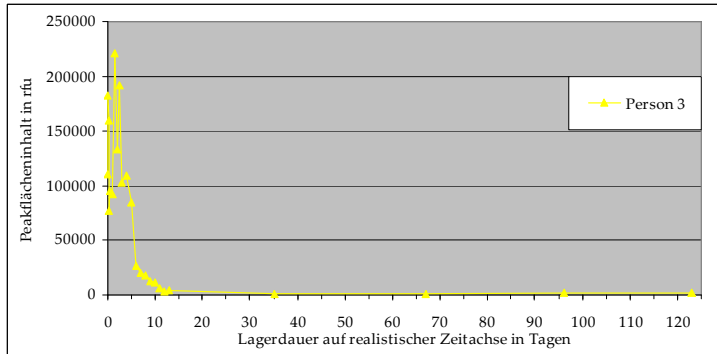
erkennen, die späteren Proben sinken wieder ab und verändern sich nur noch in geringem Maße. Die zusammengefassten Messwerte sind in Abbildung 18d dargestellt. Eine deutliche Verringerung der Mittelwerte der Intervalle fällt auf, wobei das letzte Intervall, bestehend aus nur zwei Werten, leicht nach oben abweicht. Die Betrachtung einer Standardabweichung erlaubt die Differenzierung zwischen Intervall zwei und drei und dadurch zwischen einer Lagerdauer von weniger als sechs Tagen und mehr.

Auch bei Person 5 war der zeitliche Verlauf der Peakflächeninhalte nicht stetig. Abbildung 17e zeigt, dass der Maximalwert nach einer Lagerdauer von zweieinhalb Tagen erhoben wurde. Der zweithöchste Wert war nach sechs Stunden gemessen worden und die vorhergehenden liegen sogar niedriger als bei Proben mit einer Lagerdauer von zwölf Stunden bis zwei Tagen. Eine starke Verringerung ist nach dem Maximalwert zu beobachten und ein abruptes Geringerwerden detektierbar zwischen den Werten von sechs und sieben Tagen Lagerdauer. Die darauf folgenden Werte schwanken in geringem Umfang. Sehr niedrige Peakflächeninhalte wurden erst nach einer Lagerdauer von 96 Tagen erreicht. Die Abgrenzung einzelner Intervalle ist bei der Gruppierung zu drei Tagen nicht möglich, da sich die Standardabweichungen aufgrund der stark schwankenden Werte überlappen. Trotzdem kann auch hier eine Abnahme der Mittelwerte von Intervall zu Intervall festgestellt werden (Abbildung 18e).

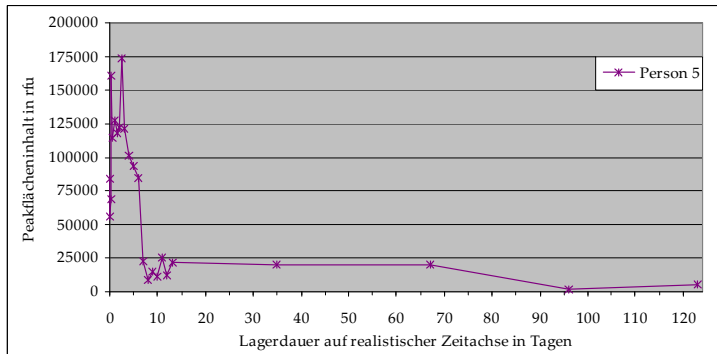
In Abbildung 17f sind die Peakflächeninhalte für Person 6 grafisch dargestellt. Es ist eine deutliche Abnahme der Werte ab einer Lagerdauer von zwölf Stunden zu erkennen, wobei der Wert von Tag 1 erheblich nach unten abweicht. Die Werte, die vor einer Lagerdauer von zwölf Stunden abgenommen wurden, wirken wiederum sehr niedrig, wie auch schon bei den anderen Personen in diesem Amplifikationssystem in unterschiedlichem Ausmaß festgestellt wurde. Die Auswertung in einzelnen Intervallen (Abbildung 18f) zeigt, dass es zu einer Abnahme der Mittelwerte kommt, wobei das letzte Intervall hiervon dezent nach oben abweicht. Die Betrachtung der Standardabweichung lässt keine eindeutige Einordnung einzelner Proben in die Intervalle zu.



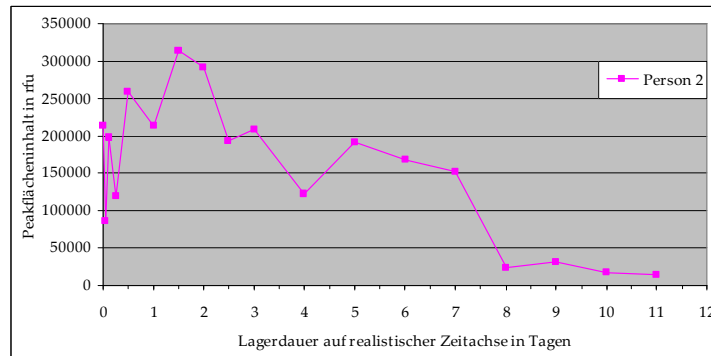
a) Person 1



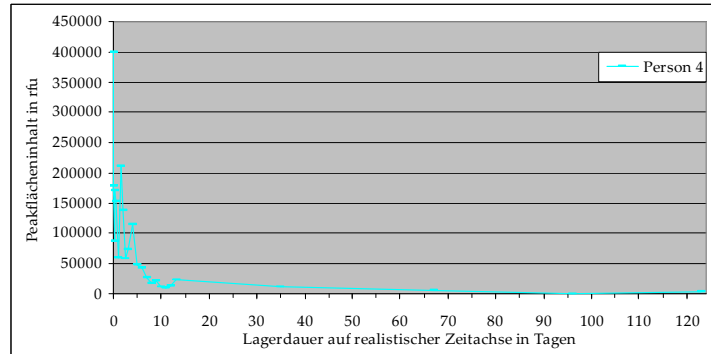
c) Person 3



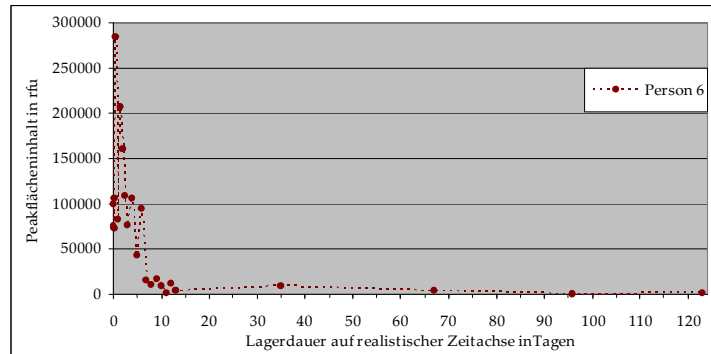
e) Person 5



b) Person 2



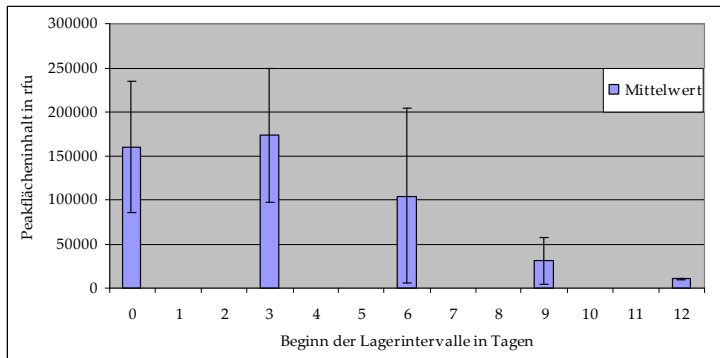
d) Person 4



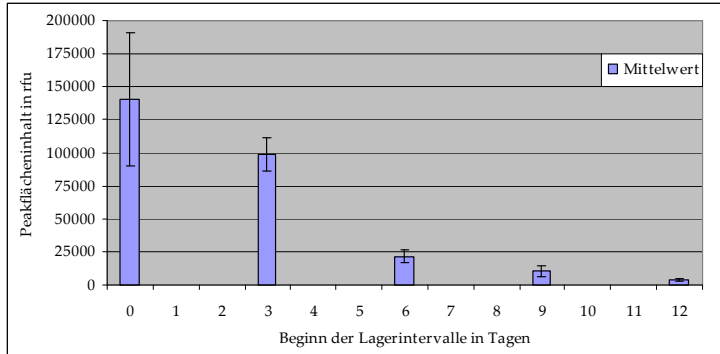
f) Person 6

Abbildung 17:

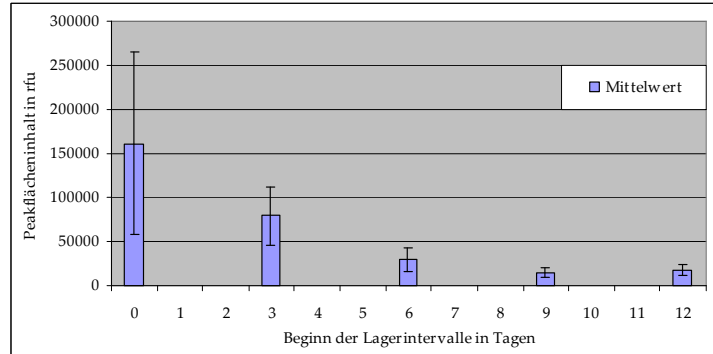
Darstellung der erhobenen Peakflächeninhalte in rfu zu allen verschiedenen Zeitpunkten über die gesamte Lagerdauer für das untersuchte Beta-Aktin-Fragment (a-f). Die markierten PCR-Produkte konnten bis zum letzten für dieses Fragment untersuchten Zeitpunkt mit einem Probenalter von 123 Tagen nachgewiesen werden.



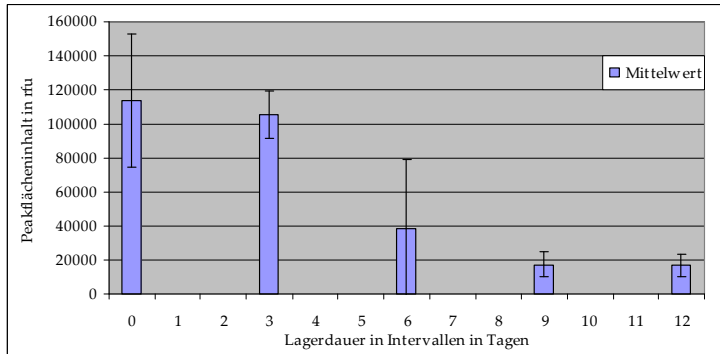
a) Person 1



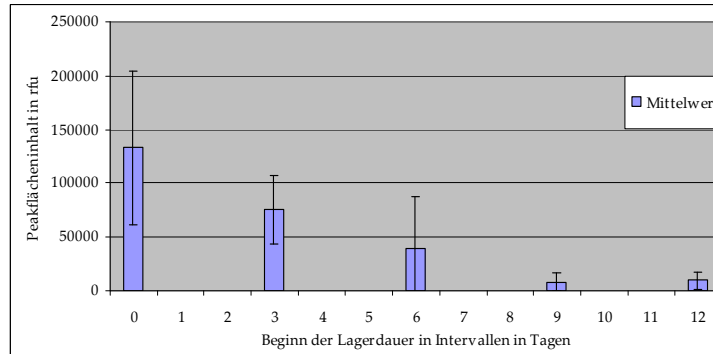
b) Person 2



c) Person 3



d) Person 4



e) Person 5

f) Person 6

Abbildung 18:

Gruppierte Darstellung der Peakflächeninhalte des amplifizierten Beta-Aktin-Abschnittes für die einzelnen Personen (a-f) anhand der Mittelwerte mit einer Standardabweichung. Die y-Achse bezeichnet den Beginn der einzelnen 3-Tages-Intervalle.

5.2.2 Ergebnisse der Real-Time-PCR

Alle erhobenen Werte bis zu einer Lagerdauer von 178 Tagen sind tabellarisch im Anhang aufgeführt (Tabelle 6). Die Darstellungen der Mittelwerte der Ct-Werte für Extrakt 1 und 2 von Person 1 sind in Abbildung 19a zu sehen. Es fällt auf, dass sich die Werte mit einer Lagerdauer von weniger als drei Tagen deutlich um ungefähr einen Ct-Wert oberhalb der Werte ab drei Tagen befinden. Die für den Mittelwert herangezogenen Daten einer Lagerdauer von 35 und 67 Tagen weichen stark voneinander und dadurch auch zu geringeren Ct-Werten hin im Vergleich zu den Ct-Werten bei kürzerer Lagerdauer ab. Die in Abbildung 20a aufgezeigten Gruppen beschreiben die Lage der Mittelwerte der gemessenen Ct-Werte und ihre Standardabweichung. Es ist eine eindeutige Zunahme des Ct-Wertes, der ein späterer Beginn der exponentiellen Phase der PCR und somit eine geringere Ausgangsmenge an RNA entspricht, dargestellt. Die Bereiche der Standardabweichung überlappen nicht vom ersten zum zweiten Intervall, vom zweiten zum dritten Intervall sehr geringfügig, zum vierten und fünften Intervall hin stärker.

Die gemittelten Ct-Werte von Person 2 (Abbildung 19b) schwanken im Anfangsbereich bis zu einer Lagerdauer von einem Tag stärker als danach. Der 5-Tages-Wert stellt hierbei eine Ausnahme dar. Der kleinste Ct-Wert wurde mit 26,4 direkt nach der Blutabnahme gemessen, der größte mit 34,1 nach zehn Tagen. Wiederum zeigt die gruppierte Darstellung in Abbildung 20b die Überlappung der Standardabweichungen zwischen den ersten beiden Intervallen. Es ist eine stetig geringer werdende Abnahme der Mittelwerte zu erkennen. Von anfangs etwa zwei Einheiten auf der Ct-Skala zwischen Intervall eins und zwei auf 1,3 Einheiten innerhalb der nächsten beiden und bis auf eine Einheit Unterschied zwischen drittem und viertem Intervall.

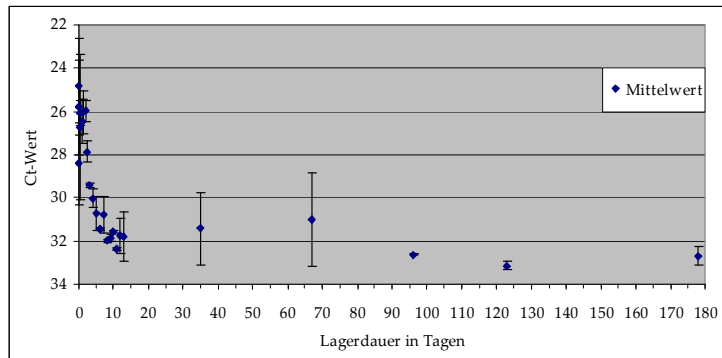
In der Darstellung von Abbildung 19c erkennt man eine Häufung der Messwerte von null bis zu einer Lagerdauer von zweieinhalb Tagen. Die darauf folgenden Ct-Werte befinden sich alle oberhalb von 34 Zyklen, der Messwert 67 Tage stellt zu kleineren Ct-Werten hin eine deutliche Abweichung dar. Auch die Daten der 96, 123 und 178 Tage lang gelagerten Proben zeigen eine höhere RNA-Menge an. Die Gruppierung der Daten bis Tag 13 zeigt einen Sprung der Mittelwerte und ihrer Standardabweichung vom ersten zum zweiten Intervall hin, der fast drei Ct-Werte ausmacht. Die Veränderung der nachfolgenden Gruppen ist kleiner, wobei es zu einer weiteren Zunahme der Mittelwerte kommt, wie in Abbildung 20c veranschaulicht ist. Das Intervall von 13 Tagen Lagerdauer, das nur aus zwei Einzelmesswerten besteht, weicht hiervon geringfügig ab.

Bei Betrachtung der in Abbildung 19d gezeigten Ct-Werte bei Person 4 erkennt man eine deutliche Absenkung der amplifizierbaren RNA-Menge in den Proben, die sich in einer erhöhten Zyklenzahl bei zugenommener Lagerdauer niederschlägt. Der erste Wert liegt am geringsten und

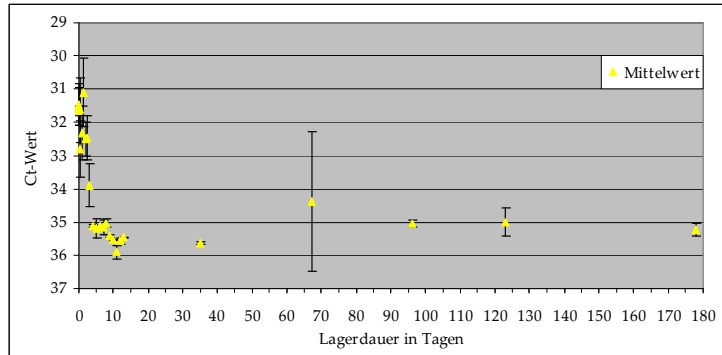
viele der darauf folgenden Werte kumulieren nahe einem Ct-Wert von rund 35,5 Zyklen. Ab einer Lagerungsdauer von drei Tagen steigen die Ct-Werte stetig mit geringen Schwankungen. Die nachgelagerten Extraktionszeitpunkte 35, 67 und 123 Tage weichen im Verlauf zu geringeren Werten hin ab. Im Vergleich zum 97-Tages-Wert liegt der letzte erhobene Ct-Wert mit 37,24 Zyklen auch dezent niedriger. Die Betrachtung der oben genannten Ergebnisse in Gruppen wie in Abbildung 20d gezeigt, macht die eindeutige Diskriminierung der Messwerte voneinander deutlich. Zwar überlappen die Bereiche der Standardabweichung der vier letzten Gruppen, aber es liegt eine breite Spanne zwischen erstem und zweitem Intervall. Bis auf das letzte Intervall ist eine stetige Erhöhung der Mittelwerte auffällig.

Bei Person 5 mit den in Abbildung 19e zu sehenden Messpunkten liegt der erste Wert ebenfalls am niedrigsten. Eine starke Veränderung ist ab einer Lagerdauer von zwei Tagen festzustellen. Nach einer Lagerdauer von 67 Tagen ist Abweichung zu geringeren Zyklenzahlen detektierbar, wobei nur zwei Einzelwerte von großer Unterschiedlichkeit zum veranschaulichten Datenpunkt beitrugen. Der Verlauf der Mittelwerte der Gruppen, der in Abbildung 20e dargestellt ist, ähnelt vorangegangenen Grafiken der anderen Probanden. Es zeigt sich ein stetiger Anstieg dieser Mittelwerte, nur der letzte liegt um 0,01 Zyklen niedriger als der vorherige. Die Betrachtung der Standardabweichung lässt eine Abgrenzung der Proben zwischen Intervall eins und zwei zu, eine minimale Überlappung der Bereiche der Standardabweichung findet sich von Gruppe zwei zu drei. Die übrigen lassen sich wenig voneinander trennen.

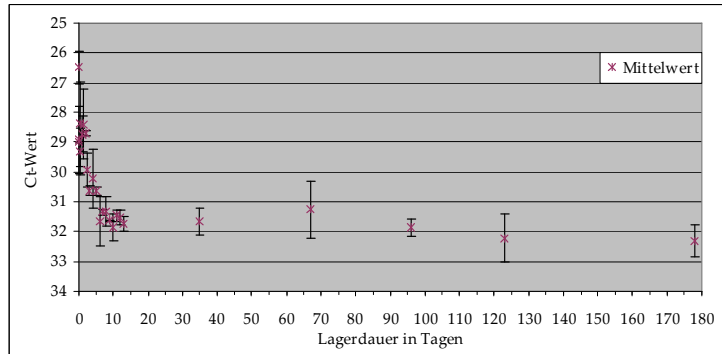
Abbildung 19f zeigt die Ct-Werte des letzten Probanden im zeitlichen Verlauf. Wiederum ist der erste Messwert der niedrigste und es folgt eine Zunahme der Mittelwerte mit steigender Lagerdauer. Die Werte von Tag 67 und 96 weichen bei hoher Variabilität stärker und die von Tag 178 gering zu kleineren Zyklenzahlen vom fiktiven Verlauf ab. In der gruppierten Einschätzung, die Abbildung 20f ermöglicht, erkennt man eine Erhöhung der Mittelwerte der länger gelagerten Proben, wobei im letzten Intervall eine dezente Abweichung hiervon vorliegt. Trotz der breiten Spanne, die die Standardabweichung einschließt, ist es möglich, Proben des ersten Zeitintervalls von nachfolgenden abzugrenzen. Wie schon bei allen anderen Probanden zu sehen war, wird anhand der zu Beginn stärker ansteigenden Mittelwerte erneut deutlich, dass die Degradation der amplifikaterbringenden RNA-Menge zu Beginn viel schneller abzulaufen scheint als in der Folge.



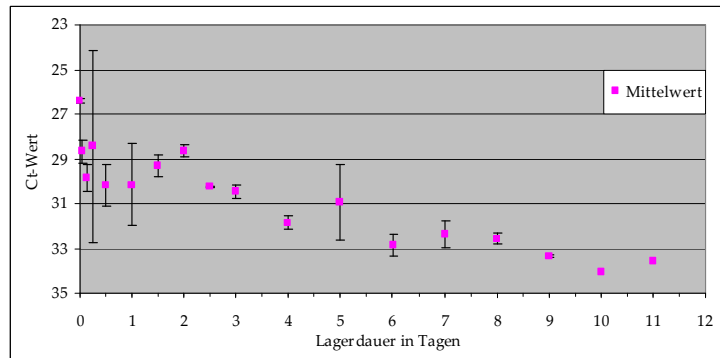
a) Person 1



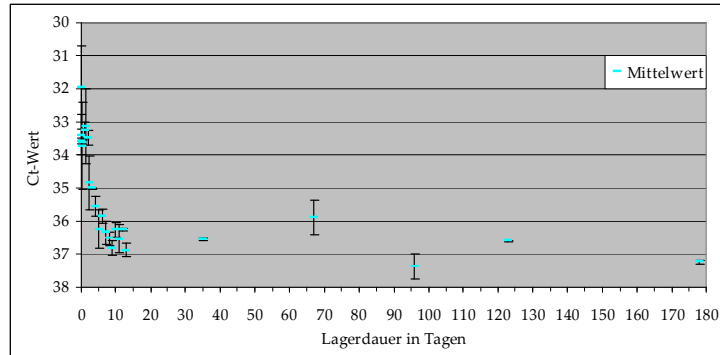
c) Person 3



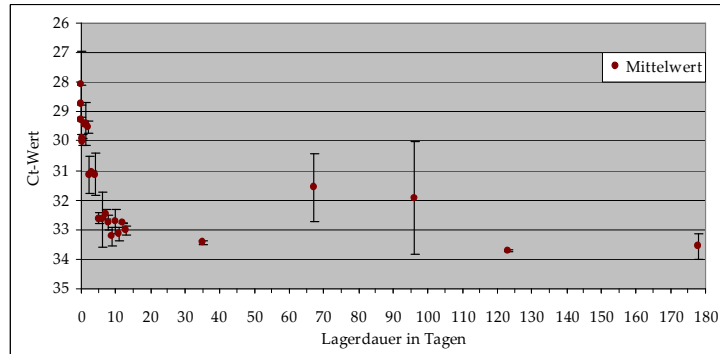
e) Person 5



b) Person 2



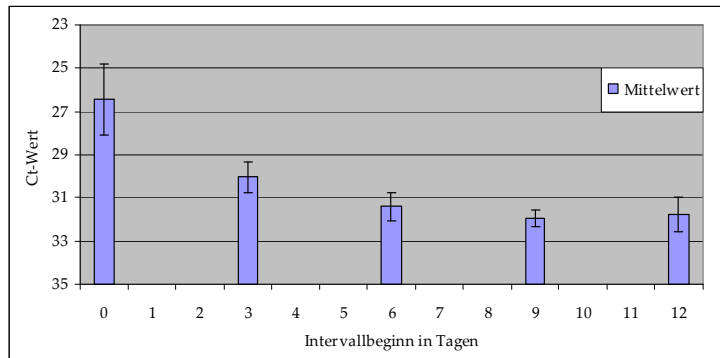
d) Person 4



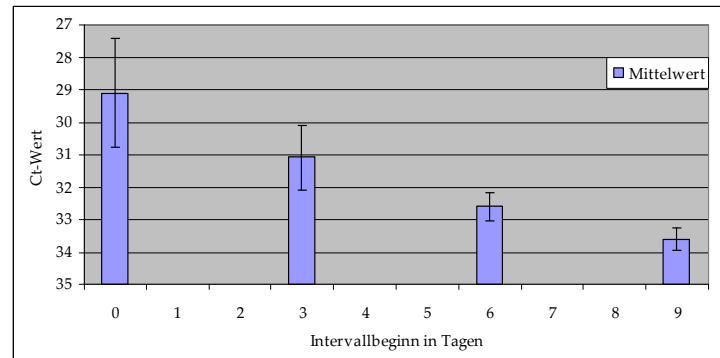
f) Person 6

Abbildung 19:

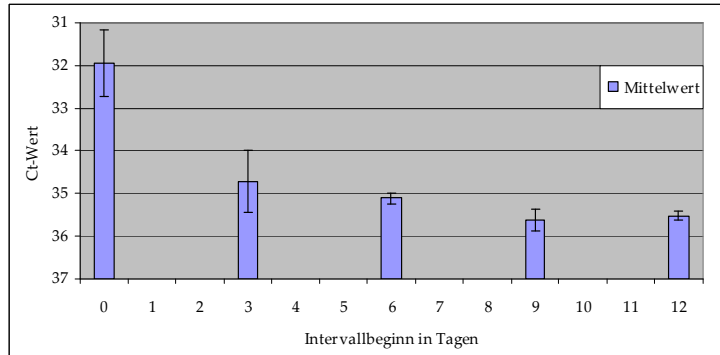
Darstellung gemessener Ct-Werte bei der Amplifikation des Beta-Aktin-Abschnittes. Aus den Ergebnissen der Extrakte 1 und 2 pro Person (a-f) wurden für jeden Zeitpunkt Mittelwerte errechnet, die grafisch mit einer Standardabweichung über die gesamte Lagerdauer von 178 Tagen dargestellt werden.



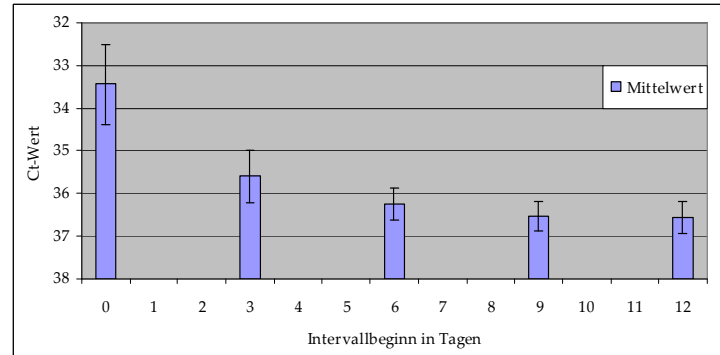
a) Person 1



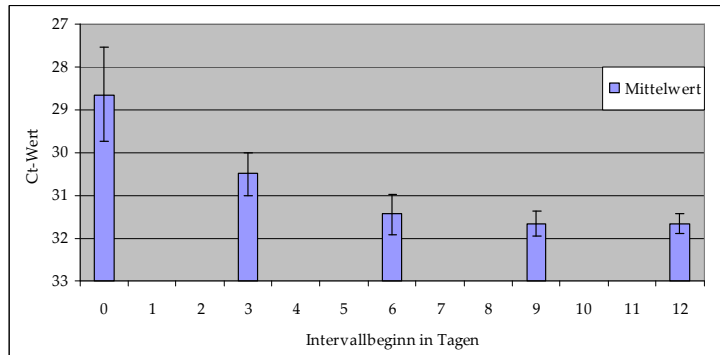
b) Person 2



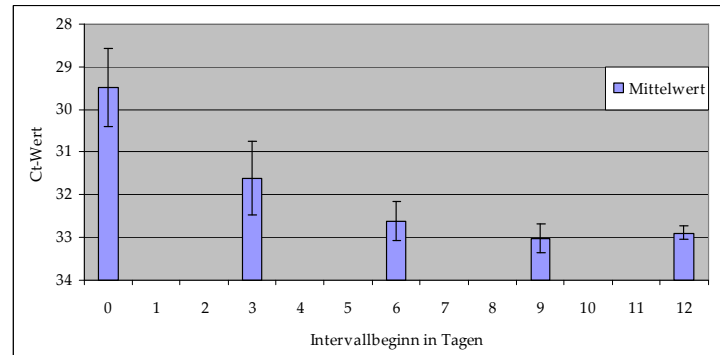
c) Person 3



d) Person 4



e) Person 5



f) Person 6

Abbildung 20:

Gruppierte Darstellung der Ct-Werte der einzelnen Personen (a-f) für den amplifizierten Beta-Aktin-Abschnitt anhand der Mittelwerte mit einer Standardabweichung. Die y-Achse bezeichnet den Beginn der einzelnen 3-Tages-Intervalle.

5.2.3 Gemeinsame Betrachtung der Ergebnisse von GAPDH, Interleukin-1-Beta und Beta-Aktin

Jedes der verwendeten Systeme stellt deutliche gleichsinnige Veränderungen der jeweiligen Messwerte dar, die für die Ausgangsmenge an RNA stellvertretend stehen. Im Folgenden werden für jede untersuchte Person die einzelnen mRNA-Amplifikate und die verwendeten PCR-Methoden vergleichend dargestellt. Beginnend mit Proband 1 (Abbildung 21a) erkennt man in allen Systemen eine Degradation spezifischer mRNA anhand der Abnahme der Produktmenge. Dies spiegelt sich wiederum durch einen steigenden Ct-Wert im Verlauf der Lagerungszeit wider. Schwankungen sind teilweise in allen Systemen zum gleichen Zeitpunkt aufgetreten wie beispielsweise der niedrige Wert von zwölf Stunden zeigt, der nur für Extrakt 2 in die Gegenrichtung abweicht. Die längste Nachweisbarkeit hoher Peakflächeninhalte bei der Auswertung mit PCR und Fragmentlängenanalyse im ABI PRISM™ zeigte das Amplifikat von Beta-Aktin, welches allerdings – wie oben beschrieben – erhebliche Senkungen der Anfangswerte aufwies.

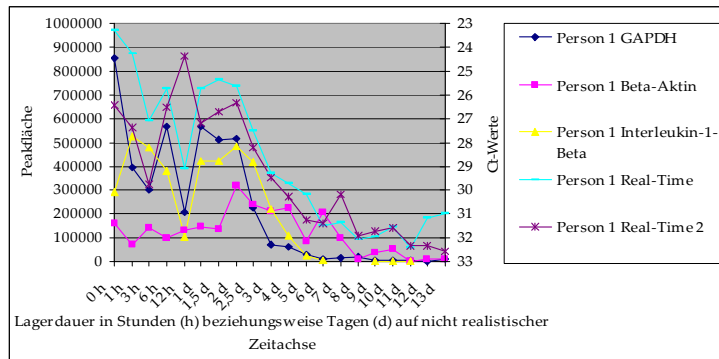
Auch bei Person 2 ist in der Zusammenschau aller Amplifikationsmodi in Abbildung 21b ersichtlich, dass es zu einer Degradation der RNA bei steigender Lagerdauer kommt. Die geringsten Schwankungen der Peakflächeninhalte waren im System Interleukin-1-Beta zu verzeichnen, wobei die Nachweisbarkeitsdauer hier geringer als in den anderen Systemen war. Wie in Tabelle 4 dargestellt, lag für den 12-Stunden-Wert von GAPDH kein Produktpeak vor. Da aber für alle anderen Fragmente zu diesem Zeitpunkt Peaks im Falle der Fragmentlängenanalyse beziehungsweise Produkt in der Real-Time-PCR mit Extrakt 1 und 2 vorlagen, ist es vorstellbar, dass es sich um einen technischen Fehler gehandelt haben könnte.

Beim Vergleich der Amplifikationsmethoden und Fragmente für Person 3 in Abbildung 21c erkennt man wiederum deutliche Veränderungen aller Systeme im Sinne einer mRNA-Degradation. Am stärksten ist dies für die Real-Time-PCR von Beta-Aktin und GAPDH ersichtlich. Die Anfangswerte für Beta-Aktin, amplifiziert im Thermocycler, liegen verhältnismäßig gering zu allen anderen Systemen, aber auch zu den später gemessenen Werten. Die Veränderungen der Messwerte nach Tag 6 sind bei der Durchführung als Real-Time-PCR deutlicher. Wie Abbildung 21d für Person 4 zeigt, ähnelt die Verlaufskurve der Peakflächeninhalte für GAPDH derjenigen für die Zyklenzahl bei der Real-Time-PCR mit Extrakt 1 von Beta-Aktin. Trotz anfangs höheren Peakflächeninhalten von Interleukin im Vergleich zu Beta-Aktin, fallen die Werte früher ab und die Nachweisbarkeitsdauer ist kurz. Bei allen Probanden findet sich deshalb ein Schnittpunkt beider Kurven, welcher zeitlich grob zwischen einem halben und vier Tagen Lagerdauer einzuordnen ist und durchschnittlich bei zwei

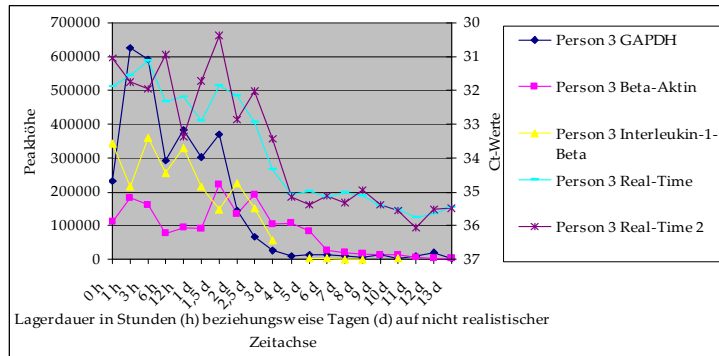
Tagen liegt. Die Abnahme produktliefernder RNA-Ausgangsmenge ist indirekt über die resultierende Produktmenge beziehungsweise die zunehmende Zyklenzahl in allen Systemen auch bei Person 4 nachweisbar.

Eine gute Übereinstimmung hinsichtlich der Schwankungen einzelner Peakflächeninhalte der verschiedenen Systeme erkennt man in Abbildung 21e für Person fünf. Vergrößerungen der Peakflächeninhalte von GAPDH und Interleukin gehen mit verringerten Zyklenzahlen der Real-Time-PCR einher. Wenn die beiden Systeme Interleukin und GAPDH verglichen werden, ist bei allen Probanden ersichtlich, dass es trotz höherer Anfangswerte und längerer Nachweisbarkeitsdauer zu einem rascheren Geringerwerden der Peakflächeninhalte im System GAPDH kommt, so dass sich ein geschätzter Schnittpunkt der Verläufe der Interleukin- und GAPDH-Messpunkte zu einer Lagerdauer von anderthalb bis drei Tagen einstellt und durchschnittlich bei zweieinviertel Tagen liegt. Ein zweiter Schnittpunkt ergibt sich, wenn die Werte von Interleukin sich verringern und der Nachweisgrenze nähern. Dieser befindet sich bei den Probanden zwischen Tag 3 und 6 der Lagerdauer, im Durchschnitt liegt er bei viereinhalb Tagen. Die Einschätzung wird durch teilweise fehlende Daten im Interleukin-System erschwert, wie bei Person 3 in Abbildung 21c sowie bei Person 6 in Abbildung 21f dargestellt ist.

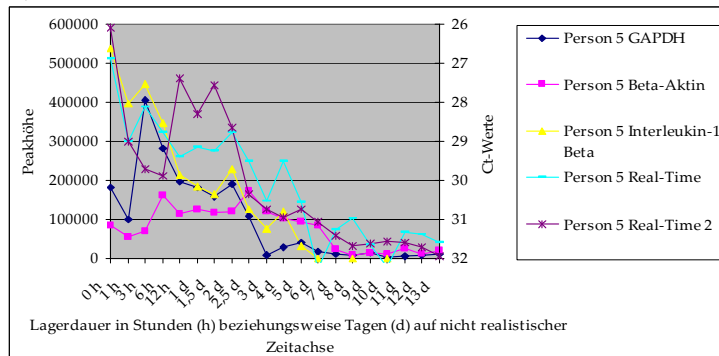
Die größten Unterschiede zwischen anfänglichen Peakflächeninhalten und späteren Werten sind in den Systemen GAPDH und Interleukin-1-Beta festzustellen. Bei Person 6 in Abbildung 21f fällt besonders auf, dass die Anfangswerte aller drei Fragmente recht gering ausfallen, wobei sich auch die Kurve der Ct-Werte mit Extrakt 1 anfangs flach verhält. Die Amplifikation der Fragmente für GAPDH und Interleukin erfolgte ebenfalls mit Extrakt 1. Auf die zu geringen Werten abweichenden Peakflächeninhalte für Beta-Aktin wurde bereits eingegangen, dennoch ist Beta-Aktin das Fragment mit den am längsten zahlreichen nachweisbaren Produkten und der damit langsamsten Degradation, so dass vergleichbar niedrige Peakflächeninhalte der anderen Systeme erst zwischen Tag 6 bis 8 erreicht werden.



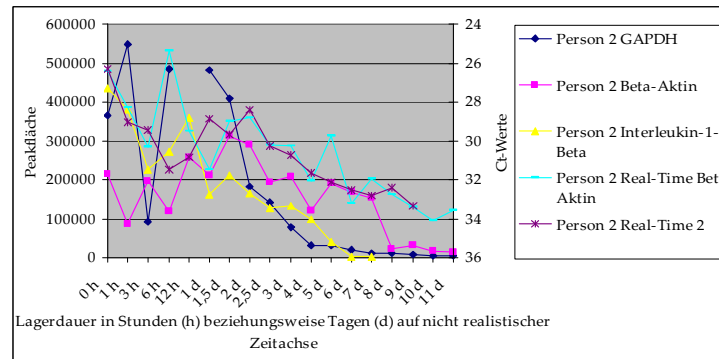
a) Person 1



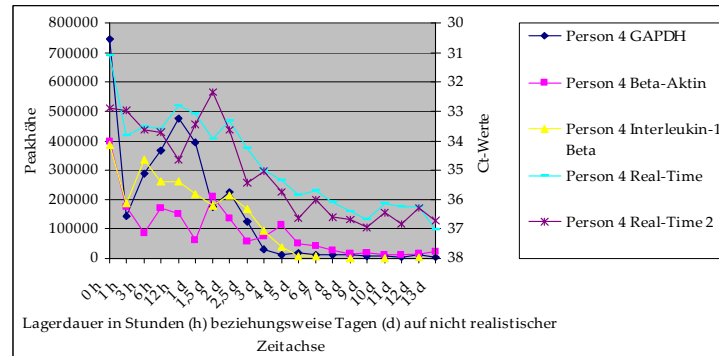
c) Person 3



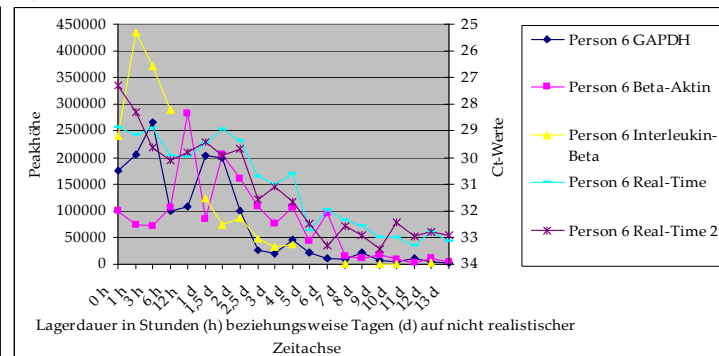
e) Person 5



b) Person 2



d) Person 4



f) Person 6

Abbildung 21:

Übersicht über alle erhobenen Peakflächeninhalte in rfu und Ct-Werte in Abhängigkeit von der Lagerdauer je Proband (a-f).

Die linke y-Achse gilt für die Datenreihen Interleukin-1-Beta, GAPDH und Beta-Aktin. Die rechte y-Achse gibt die Einheiten für die Real-Time-Daten wieder.

Zur übersichtlicheren Darstellung der eng liegenden Anfangswerte wurde eine nicht reale Zeitachse verwendet.

5.2.4 Vergleich von PCR und Real-Time-PCR

Die Standardabweichung der bestimmten Ct-Werte ist deutlich geringer als die der Peakflächeninhalte der gewöhnlichen PCR mit Fragmentlängenanalyse des Beta-Aktin Fragmentes. Die Abgrenzbarkeit zwischen den Gruppen erhöht sich dadurch deutlich, wie beispielsweise im Vergleich der Abbildungen 18d und 20d zu sehen ist. Es zeigt sich, dass im Gegensatz zur einfachen PCR vor allem im frühen Lagerungsbereich keine derartige Schwankung der Werte auftritt und dass diese frühen Werte im Vergleich zu später gewonnenen Extrakten deutlich höher liegen. Die Degradation intakter mRNA ist besser nachweisbar.

6 Diskussion

6.1 Grundlagen für die Verwendung der gewählten Methoden und Bewertung im Rahmen der Untersuchung

6.1.1 Methoden der RNA-Extraktion

Prinzipiell gibt es zwei Möglichkeiten der Extraktion von RNA: Isolation von Gesamt-RNA oder Isolation von mRNA, die nur etwa 1-3 % der Gesamt-RNA einer Zelle ausmacht. Bei Zellen eukaryontischer Herkunft findet sich fast immer ein posttranskriptionell angefügter Poly-A-Schwanz am 3'-Ende der mRNA, der die Separation dieser RNA-Art von allen anderen ermöglicht (Surzycki 2000). Da es sich bei der vorliegenden Studie um die Untersuchung degradierter RNA handelt, ist es ungünstig, von vornherein nur RNA mit vorhandenem Poly-A-Endstück zu extrahieren, da dadurch nur Moleküle, die am 3'-Ende intakt sind, einer Amplifikation zugeführt werden und sich dementsprechend die Nachweisbarkeitsdauer schneller erheblich reduzieren könnte.

Auf der Suche nach einer einfachen Methode, die es ermöglicht, Gesamt-RNA hoher Qualität ohne Kontamination mit genomischer DNA und Proteinen auch aus geringen Ausgangsmengen von Blut einfach, schnell und sicher zu gewinnen, erschien der SV Total RNA Isolation Kit von PROMEGA gegenüber den Extraktionsprotokollen mit organischen Lösemitteln und gegenüber anderen fertigen Kits für diese Fragestellung am praktikabelsten und kostengünstigsten (Hara et al. 2002, Surzycki 2000). Vorteilhaft war hierbei unter Berücksichtigung der speziellen Fragestellung zur RNA-Degradation auch, dass das System unter Verwendung von Guanidinthiocyanat und Betamercaptoethanol arbeitet. Diese beiden Stoffe inaktivieren RNAsen, RNA abbauende Enzyme, die regelhaft im Blut vorkommen und beim Aufschluss der Zellmembran sehr schnell zur RNA-Degradation führen können (Reddi und Holland 1976).

6.1.2 Methoden zur Quantifizierung der extrahierten RNA

Zur Vergleichbarkeit verwendeter Proben, die aufgrund von unterschiedlichem Gehalt an Blutzellen bei jedem Menschen eine individuelle Ausbeute an RNA liefern, müsste man die Zellzahl für alle Proben gleich halten, indem man sie mit speziellen Geräten auszählt. Bei der Verwendung von gealtertem Material zerfallen die zellulären Bestandteile aber, so dass sich die Ausbeute immer mehr verringert und dadurch ganze Zellen selten sind. Auch der Vorteil der reinen Leukozytenverarbeitung, der in einem minimierten Gehalt an PCR-Inhibitoren wie Porphyrinen und Hämatin (Macfarlane und Dahle 1993), die im Plasma verbleiben, besteht, entgeht.

Wenn man den Normbereich an Kern- und RNA-haltigen Zellen, den Leukozyten, des untersuchten Mediums Blut zugrunde legt, der bei 4 bis 10 mal 10^9 liegt, kann der Gehalt bei gesunden Probanden um etwa das Zweieinhalbfache schwanken. Eine Lösung für dieses Problem wurde in dieser Untersuchung nicht gefunden und die Quantifizierung der RNA auf den Schritt nach der Extraktion festgelegt, wobei durch Verluste während der Extraktion schon erhebliche Schwankungsbreiten des Gehaltes an RNA in den einzelnen Proben akzeptiert werden müssen, die nur durch Sorgfalt einzugrenzen sind. Leider gab es bei Beginn der vorliegenden Studie noch keine Extraktionskits, die eine Referenzsubstanz mitführen und dadurch die Güte der Extraktion und die Verlusthöhe einschätzbarer machen.

Die elektrophoretische Darstellbarkeit von 28S- und 18S-rRNA-Banden durch Auftrennung der Gesamt-RNA des Extraktes, die häufig zur Anwendung kommt, unterliegt genauso den Degradationsvorgängen bei Lagerung wie die zu untersuchenden mRNA-Spezies (Inoue et al. 2002) und eignet sich in deshalb diesem Fall nicht zur Standardisierung eingesetzter RNA-Mengen.

Die Bestimmung der extrahierten Menge an RNA vor der Amplifikation kann trotzdem Differenzen aufgrund von technischen Schwierigkeiten oder unterschiedlicher Zellzahl in der Probe im Nachhinein durch die Verwendung angepasster Extraktmenge für die PCR ausgleichen, indem man Verdünnungen verwendet und dadurch die absolute Menge an Gesamt-RNA im Reaktionsgefäß konstant hält. Hierfür ist es aber erforderlich, dass die Menge an intakter und degradierter RNA als Gesamtgehalt messbar ist. Würde nur intakte RNA gemessen, würde sich der Gehalt im Laufe der Lagerung verringern und eine Anpassung der eingesetzten Menge auf gleiche Endergebnisse hinauslaufen. Ungeachtet der einzelnen Spezies und des Degradationsgrades kann man die Gesamtmenge an RNA spektrophotometrisch abschätzen (Bauer et al. 2003a). Vorausgesetzt wird hierbei, dass es nicht zu einem Degradationsgrad kommt, der auch die Purin- und Pyrimidinringe spaltet und somit die Grundlage der Absorptionsmessung entfallen ließe.

Laut Informationen des Herstellers des SV Total RNA Isolation Systems würden pro Milliliter verwendeten Vollblutes näherungsweise 0,75 bis 1,50 μg total RNA gewonnen. Bei der Betrachtung von 100 μl Eluat wären rechnerisch demnach Konzentrationen zwischen 7,5 und 15 $\text{ng}/\mu\text{l}$ zu erwarten. Die spektrophotometrische Bestimmung von Reinheit und Gehalt von RNA-Lösungen, die aus Blut gewonnen wurden, wird jedoch im Handbuch zu dem verwendeten Extraktionskit nicht empfohlen, da Vollblut aufgrund des relativ geringen Leukozytengehaltes von etwa 1 % nur zu einer geringen Ausbeute an RNA führe (Promega Corporation 2003).

Bei der Verwendung von Vollblut kann erschwerend hinzukommen, dass trotz

zwischengeschalteter Reinigungsschritte DNA-Fragmente und Nikotin in der Lösung vorhanden sein könnten. Diese Moleküle stören möglicherweise die Quantifizierung mit dem Spektrophotometer, da auch sie ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm aufweisen. Trotz an sich grob im erwarteten Bereich liegender Messwerte der RNA-Extrakte, waren diese mit den Ergebnissen von PCR und Quantifizierung nicht zu vereinbaren.

Üblicherweise wird die spektrophotometrische Methode angewendet, um Nukleinsäuremengen abzuschätzen, denen ein weitestgehend undegradierter Zustand unterstellt wird. Auf die hier verwendeten Proben trifft dies allerhöchstens für die ersten drei Tage zu. Tatsächlich eignete sich die spektrophotometrische Analyse für diese Studie nicht, um extrahierte RNA zu quantifizieren, damit vergleichbare Mengen für die PCR eingesetzt oder Vorhersagen zur Qualität der Lösungen und zur zu erwartenden Ausbeute der Amplifikationsreaktion getroffen werden können.

6.1.3 Möglichkeiten der Standardisierung

Um Unterschiede der Amplifikationseffizienz nachweisen und berücksichtigen zu können, ist es möglich, externe oder interne Standards zu verwenden. Die Coamplifikation eines Fragmentes, das regelhaft intrazellulär vorkommt, schien für diese Untersuchung ungünstig, da auch diese interne RNA den stattfindenden Degradationsvorgängen unterliegt. Das Zurückgreifen auf zusätzliche house-keeping Gene, die bei RNA-Untersuchungen gerne als relative Marker verwendet werden, ist somit nicht sinnvoll. Zur Standardisierung der Quantifizierung ist es auch möglich, bekannte Mengen einer Referenz-RNA zeitgleich zu amplifizieren, deren PCR-Produkt eine kleine Deletion oder Insertion aufweist, ansonsten dem Template aber sehr ähnlich ist (kompetitive PCR). Dadurch sollen Reaktionsunterschiede und eine potentiell variierende Effizienz der Amplifikation ausgeglichen werden. Der Nachteil dieses Vorgehens besteht darin, dass für jedes Fragment eine eigene Mutante mit einer Deletion von fünf bis 15 Nukleotiden, entsprechend einer Längendifferenz von fünf bis zehn Prozent, hergestellt werden muss und dass von einer exakt gleichen Amplifikationseffizienz von Template und Kompetitor trotzdem nicht ausgegangen werden kann (Hayward et al. 1999). Bei der Standardisierung mit einer Referenz RNA, die hingegen ein breites Spektrum an verschiedenen RNAs umfasst und somit vielfältiger einsetzbar ist, können sich aufgrund der Struktur und abweichenden Größe Unterschiede in der Amplifikationseffizienz noch leichter manifestieren (Becker-André 1995).

Insgesamt ist es schwierig, weitere Templates simultan zu amplifizieren, da es hierbei zu einer zusätzlichen Anhäufung von Amplifikaten kommt, die die PCR beeinflussen können (Murphy et al. 1990, Kinoshita und Shimotohno 1995). Die zugegebene Referenz-RNA muss außerdem quantitativ auf die interessierende RNA abgestimmt sein, da es sonst sogar zu einer kompletten

Supprimierung der Amplifikation des eigentlichen Targets kommen kann (He et al. 1995). Es ist davon auszugehen, dass schon geringe Variationen aufgrund der exponentiellen Amplifikation mit starken Veränderungen der finalen Produktmengen einhergehen.

Aufgrund der in der vorliegenden Studie ohnehin schwierigen Quantifizierbarkeit der Ausgangsmengen der RNA, verbunden mit den sehr aufwendigen Voruntersuchungen zur Konstruktion kompetitiver RNA-Fragmente für alle gewählten mRNA-Abschnitte und der zusätzlich verbleibenden Unsicherheit bezüglich der Amplifikationseffizienz, wurde keine dieser Formen der internen Standardisierung angewendet.

Stattdessen sind bei der RT-PCR bereits positiv getestete Proben, bei der Real-Time-PCR verschiedene Verdünnungen einer Standard-RNA in doppelter Ausführung und eine davon unabhängige Kanamycin-Kontroll-Probe mitgeführt worden.

Mittlerweile gibt es prinzipiell Systeme, die sowohl positive Kontrollen für die Aufreinigung von RNA als auch für die RT-PCR bereithalten, wie den artus[®] LC SARS RT-PCR Kit von Qiagen zur Virendetektion. Für die in vorliegender Untersuchung gewählte Fragestellung war bisher kein System zu finden.

6.1.4 Amplifikationsmethoden und Quantifizierung nach der PCR

6.1.4.1 Methoden der RNA-Amplifikation

Zur Amplifikation von RNA existieren grundsätzlich drei verschiedene Methoden (Larrick und Siebert 1995). Die Herstellung einer großen Menge von cDNA kann entweder mit mehreren so genannten random Primern geschehen, wobei es sich um hexamere Oligonukleotide verschiedener Basenfolge handelt, oder mit Hilfe von Oligo (dT)-Primern, die am Poly-A-Ende der mRNA ansetzen. In einer nachfolgenden Amplifikation mit spezifischen Primern wird dann die gewünschte Sequenz vervielfältigt (Rappolee et al 1989).

Das dritte Verfahren stellt die nicht durch weitere Pipettierschritte unterbrochene, dadurch weniger aufwendige und insgesamt zeitsparende one-step-RT-PCR, auch one-tube-RT-PCR (Goblet et al. 1989) genannt, dar. Die Enzyme Reverse Transkriptase und DNA-Polymerase liegen dabei zeitgleich vor. Durch die Kompatibilität der Bestandteile der cDNA-Synthesereaktion mit denen der PCR kann die gesamte Reaktion nacheinander im selben Reaktionsgefäß ablaufen (Chelly et al. 1988). Es erfolgt die Amplifikation von cDNA eines konkreten mRNA-Abschnittes mit Hilfe zweier genspezifischer Primer, wobei zunächst zu der mRNA in einem vorgeschalteten Inkubationsschritt durch Hybridisierung mit nur einem Primer, dem 3'-antisense Primer, mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase ein komplementärer cDNA-Strang synthetisiert wird. Dieser kann anschließend durch die gewöhnliche dreistufig-zyklische PCR-

Methodik, bestehend aus Denaturierung des DNA-Doppelstrangs zu Einzelsträngen, Hybridisierung beider Primer (Annealing) und Elongation des Komplementärstranges durch den 5'-sense Primer in 3'-Richtung, vervielfältigt werden. Die deutlich höhere Sensitivität dieser One-Step-PCR im Vergleich zur Two-Step-PCR (Goblet et al. 1992) stellte eine günstige Voraussetzung zur Verwendung des Verfahrens für die vorliegende Studie dar. Alle beschriebenen Möglichkeiten lassen sich unter dem Begriff RT-PCR (Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion) zusammenfassen.

Die vorliegende Untersuchung sollte Labormethoden entwickeln, die leicht in die Routinearbeit zu übernehmen sind, möglichst wenig Zeit beanspruchen und eine geringe Zahl an Arbeitsschritten aufweisen, um die Möglichkeit einer Kontamination und Degradation gering zu halten. Unter diesen Gesichtspunkten wurde die One-Step-RT-PCR ausgewählt, die allerdings den Nachteil aufweist, dass die experimentellen Parameter wie Primerkonzentration und Annealingtemperatur zuvor optimiert werden müssen (Larrick und Siebert 1995).

Im zweiten Teil der Untersuchung wurden die Amplifikationen im Real-Time-Gerät durchgeführt. Der vorteilhafte Ansatz der One-Step-RT-PCR blieb hierbei erhalten. Die Methode stellte sich als einfach und sehr praktisch dar, da zeitgleich bis zu 96 Proben verarbeitet werden konnten, wobei die Quantifizierung sogleich erfolgte. Hervorzuheben ist dabei, dass die Durchführung der PCR in Real-Time-Form erheblich weniger Zeitaufwand benötigte und sich die Proben aufgrund einer geringeren Anzahl an Pipettierschritten sicherer verarbeiten ließen. Zwar ähnelten sich der zeitliche Aufwand zur Vorbereitung einer PCR und einer Real-Time-PCR, der Ablauf der Reaktion und die Nachbereitung unterschieden sich jedoch erheblich. Das Cycling im Real-Time-Gerät benötigte lediglich ein Drittel der Zeit im Vergleich zum Thermocycler und es entfiel jegliche weitere Verarbeitung und Lagerung der Proben. Je Lauf waren die Daten auf einmal abrufbar, leicht zu verarbeiten und zu exportieren. Insgesamt ist es bei Anwendung der in dieser Studie vorgestellten Methoden bei aufeinander folgenden Arbeitsschritten theoretisch möglich, RNA-Extraktion, -amplifikation und -quantifizierung innerhalb von drei Stunden fertig zu stellen.

6.1.4.2 Quantifizierung der Amplifikationsprodukte

Um PCR-Produkte zu quantifizieren, können entweder Nukleotide, Primer oder sequenzspezifische Sonden markiert und eingesetzt werden. Die Markierung kann radioaktiv oder fluoreszierend sein. Der Vorteil von eingesetzten Sonden ist die alleinige Detektion des korrekten PCR-Produktes, es erfolgt keine Hybridisierung mit unspezifischen Amplifikaten. Die Auswahl, Synthese und Optimierung sind jedoch teuer und zeitaufwändig. Auch mit Hilfe der

Fragmentlängenanalyse kann anhand der sehr genau zu messenden Produktgröße eine ähnlich spezifische Betrachtung erreicht werden, indem die Stärke der durch die eingebauten markierten Primer messbaren relativen Fluoreszenzeinheiten im Bereich der jeweiligen bekannten Länge des Amplifikates bestimmt wird (Porcher et al. 1992, Pannetier et al. 1993, Becker-André 1995). Die Verwendung radioaktiver Materialien, die Konstruktion geeigneter Sonden und deren zusätzliche Hybridisierungsvorgänge und mögliche Interaktionen mit den Primern entfallen.

Die Quantifizierung der Produktmenge nach Beendigung der Reaktion im Thermocycler mit der gleichen Anzahl an PCR-Zyklen für alle Proben einer mRNA-Spezies, ungeachtet ihrer Lagerungsdauer und damit ihres Degradationsgrades, kann zu Verfälschungen führen. Das Reaktionsplateau bei undegradierten Proben wird aufgrund höherer Mengen intakter mRNA eher erreicht (Sardelli 1993, Becker-André 1995) und eine weitere Vervielfältigung durch Mangel an Reaktionskomponenten, verminderte Enzymaktivität und Anhäufung von Produkten eventuell nicht ermöglicht (Nikitina et al. 2003, Larrick und Siebert 1995). Falsch niedrige Werte der Quantifizierung für Proben mit einer hohen Menge undegradierter mRNA können die Folge dieser Endpunktmessung sein.

Die Real-Time-PCR löst dieses Problem, da es zu einer Anregung fluoreszenzmarkierter Primer und Messung der daraus resultierenden Emission nach jedem abgelaufenen PCR-Zyklus kommt. Die Veränderung der ursprünglichen Fluoreszenzwerte lässt den Erfolg der Reaktion und ihren Verlauf spannend beobachtbar werden. Außerdem besteht die Möglichkeit, bei spät ersichtlicher Reaktion die Zyklenzahl während der PCR zu erhöhen und diese somit besser an den RNA-Gehalt der Proben anpassen, da sichtbar ist, ab welchem Zyklus der Beginn und das Plateau der Reaktion eintreten. Eine falsch geringe Ausbeute an Produkt von intakter RNA findet so nicht statt.

Die Quantifizierung von RNA mit Hilfe der Northern-Blot-Technik wurde als ungünstig erachtet, da aufwendige und langwierige Blotting-Technik, die Sondenverwendung und die radioaktive Strahlung die Methode für die vorliegende Untersuchung nicht lukrativ erscheinen ließen (Knippers 2006). Das Detektionslimit liegt bei 10^6 bis 10^7 mRNA Kopien, so dass der Nachweis sehr geringer RNA-Mengen nicht gelingen kann (Larrick und Siebert 1995). Die RT-PCR hingegen ist in der Lage schon eine RNA-Menge von 100 Kopien nachzuweisen. (Shuldiner AR und Ze Huang 1995, Kawasaki et al. 1988)

6.2 Diskussion der Ergebnisse im Rahmen der angewandten Methoden

6.2.1 Beurteilung der Amplifikationsresultate

Die RNA-Nachweisbarkeit war noch zum letzten untersuchten Zeitpunkt von 178 Tagen der Lagerung bei Raumtemperatur gegeben und zeugt von hoher Stabilität über einen längeren Zeitraum.

6.2.1.1 Vergleich von PCR und Real-Time-PCR

Die weitaus bessere Verarbeitbarkeit der Real-Time-Proben wurde klar ersichtlich. Keine der durchgeführten Amplifikationen verlief negativ und musste wiederholt werden. Eine Anpassung der eingesetzten RNA-Menge an das Alter der jeweiligen Proben war nicht nötig. Im Gegensatz dazu erbrachte die Beta-Aktin-Amplifikation im Thermocycler, die zuerst durchgeführt wurde, schon frühzeitig das unerwartete Auftreten von eher geringen Produktmengen für die verhältnismäßig kurze Alterung der zuerst entnommenen Proben. Die Empfehlung des Kitherstellers lautete, 1 µl RNA Extrakt für die Amplifikation spezifischer RNAs, bei denen als Beispiel Beta-Aktin genannt wurde, zu verwenden und bei geringer transkribierten RNAs bis zu 10 µl einzusetzen. Aufgrund der erwarteten Degradationsvorgänge betrug die eingesetzte RNA-Menge im Rahmen der Vorversuche 3 µl. Die Cycling-Bedingungen waren dahingehend optimiert worden, möglichst geringe Mengen an RNA nachweisen zu können, weshalb nicht bekannt ist, wie gut die Effizienz bei frischen, RNA-reichhaltigen Proben ist.

Durch die Variation der eingesetzten Menge konnte festgestellt werden, dass bei Verwendung von lediglich einem Drittel der ursprünglichen durch die Vorversuche eruierten Menge von nun nur noch 1 µl RNA-Extrakt ein Ergebnis im erwarteten Bereich erlangt werden konnte. Leider resultierten aus diesen unerwarteten Ergebnissen mehrere variierte Amplifikationen, so dass die extrahierte RNA mehrfachen Einfrier-Auftau-Zyklen unterworfen wurde. Zwar kann extrahierte, tief gefrorene RNA bis zu einem Jahr gelagert werden, ohne dass wesentliche weitere Degradation eintritt (Larrick und Siebert 1995), allerdings sollten Änderungen des Aggregatzustandes vermieden werden. Hätten die Proben aber hierdurch erheblichen Schaden erlitten, wären die später durchgeführten Versuche und Ergebnisse für Interleukin-1-Beta und GAPDH sowie für die Beta-Aktin-Analyse per Real-Time-PCR, die fünf Monate später stattfand, auch weniger gut ausgefallen, annähernd gleiche Empfindlichkeit der mRNA-Fragmente vorausgesetzt. Dies traf jedoch nicht zu.

6.2.2 Quantifizierung der Amplifikate

6.2.2.1 Fragmentlängenanalyse

Die gute und besser als erwartet ausgefallene RNA-Amplifikation erzeugte auch bei der eigentlichen Quantifizierung zunächst Probleme, da viele PCR-Produkte der Extrakte vom Zeitpunkt null Stunden bis Tag acht erneut verarbeitet werden mussten. Aufgrund zu hoher Produktmengen wurden die speziellen Peaks von der Software „abgeschnitten“, so dass falsch niedrige Peakflächeninhalte resultierten, die Rückschlüsse auf die RNA-Menge geben sollten. Deshalb mussten diese Amplifikate für die korrekte Analyse teilweise mehrfach schrittweise verdünnt werden. Die aus diesem Analyseablauf rührenden mehrfachen Einfrier-Auftau-Zyklen, die zeitweilige Lagerung unter Kühlschrank-, aber nicht Tiefkühlbedingungen und die Gesamtverzögerung der Analyse der fertigen Amplifikate über einen längeren Zeitraum könnten für deren zusätzliche Degradation verantwortlich sein. Somit ließen sich die im Vergleich zum Interleukin- und GAPDH-Fragment recht geringen Produktmengen innerhalb der ersten Tage der Lagerungsdauer beim Fragment Beta-Aktin, das als erstes verarbeitet wurde, erklären. Die anderen Produkte konnten, da die Verdünnungsfaktoren und der Hergang nun getestet waren und übernommen wurden, schneller erfolgreich gemessen werden und die Menge an Mehrfachanalysen war weitaus geringer. An sich könnte die Verringerung nachweisbarer Produkte durch die Labilität der Markerbindung an den Primern erklärt werden. Diese Kopplung ist laut Hersteller lichtempfindlich. Deshalb entgeht ein vorhandenes Produkt mit eingebautem Primer, dessen Markierung verloren gegangen ist, der Detektion.

Insgesamt besteht die Möglichkeit, dass die PCR-Produkte geschädigt wurden und dadurch die Hoffnung, dass gerade bei den nur kurz gealterten Blutproben bei einwandfreiem Analyseablauf noch deutlich höhere Werte messbar sein könnten, die zu eindeutigeren zeitlichen Verläufen führen würden. Dazu passt, dass die Daten von Person 4 für den Lagerzeitpunkt null eine Ausnahme darstellen, da diese Probe während der zwischenzeitlich nötigen Versuche zur einzusetzenden RNA-Menge früher amplifiziert und zeitnah elektrophoretisch verarbeitet worden war.

6.2.2.2 Diskussion der Ergebnisse der quantitativen Real-Time-PCR

Die Real-Time-PCR lieferte anhand lückenloser Ct-Werte plausible Produktmengen und die vorhandenen Schwankungen scheinen unsystematisch und am ehesten durch extraktionsbedingt unterschiedliche RNA-Mengen mit verursacht zu sein. Eine differierend erfolgreiche Auflösung von Zellaggregaten des im Ergebnisteil beschriebenen buffy coats durch technische Schwierigkeiten im Rahmen der Extraktion könnte dies erklären.

Die Differenz der Ct-Werte mit zunehmender Lagerdauer bedingt insgesamt einen Unterschied zwischen erstem und letztem zeitlichen Ct-Wert von fast sechs Zyklen. Rechnerisch würde dies bedeuten, dass die Menge an intakter RNA zur Amplifikation im Vergleich zur Ausgangsmenge nur noch $\frac{1}{64} \left(\frac{1}{2^6} \right)$ beträgt, dies sind 1,56 % der ursprünglich vorhandenen Menge.

Die externe Standardisierung mit RNA-Verdünnungsreihen, die in dieser Studie angewandt wurde und für einen gesamten Lauf an Proben gilt, beinhaltet keine Vergleichswerte innerhalb jedes Reaktionsgefäßes bezüglich der jeweiligen Effizienz der Amplifikation. Eine mögliche Inhibition der Reaktion durch RNA-Bruchstücke, die aufgrund der Degradation entstehen können, kann somit nicht ausgeschlossen werden.

Die sehr spät noch reagierenden Leerwerte können dadurch erklärt werden, dass ein System verwendet wurde, das mit markierten Primern arbeitet. Sobald diese Primer binden, verringert sich die Fluoreszenz. Da eine partielle Bindung an ähnliche Sequenzen im RNA-Extrakt und an Teilabschnitte des komplementären Primers vorkommen kann, ist es möglich, dass diese unspezifische Bindung zu falsch positiven Ergebnissen führt (Higuchi und Watson 1999, Kang und Holland 1999). Mit Hilfe der Analyse der Schmelzkurve konnte diese Vermutung bestätigt und zugleich eine Kontamination ausgeschlossen werden. Hierbei bewies eine um mindestens zwei Grad Celsius nach unten abweichende Schmelztemperatur, dass es sich nicht um spezifische Produkte handelte (Ririe et al. 1997).

Durch das Einsparen von Reaktionsgefäßen bei gleichzeitigem Analyse- und Amplifikationsablauf ohne gel- oder kapillarelektrophoretische Auftrennung mit nötigen Reagenzien, Protokollen sowie Geräten, war der Aufwand an Platz, Zeit und materiellen Ressourcen gering.

6.2.2.3 Nachweisbarkeitsdauer und festgelegte Intervalle

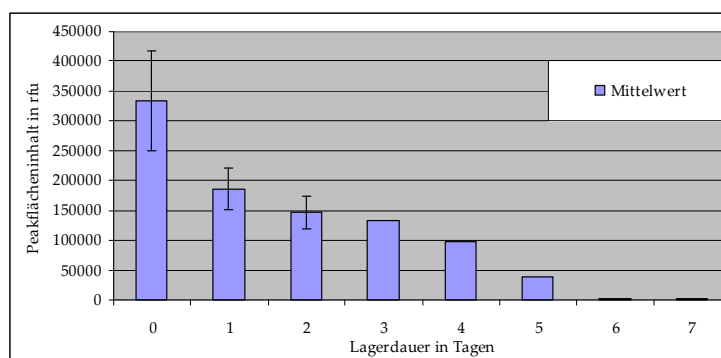


Abbildung 22: Intervall-Darstellung zu einem Tag am Beispiel von Person 2.

Für die bisherigen Daten hat sich eine Gruppierung zu 3-Tages-Intervallen wie im Ergebnisteil vorgestellt als günstig und aussagekräftig erwiesen. Die Zusammenfassung der einzelnen erhobenen Daten zu kürzeren Intervallen von beispielsweise ein oder zwei Tagen, erbrachte für das Beta-Aktin-System keine wesentlich bessere Abgrenzbarkeit der Intervalle untereinander und somit keine genauere Zuordnung von potenziellen Proben unbekannten Alters. Für Interleukin-1-Beta ist es aufgrund der raschen Produktverminderung gut vorstellbar, die Gruppierung in kürzere Intervalle vorzunehmen und eventuell dadurch genauere Aussagen zur Lagerzeit machen zu können, wie Abbildung 22 zeigt.

6.2.2.4 Interpretation der verschiedenen Degradationsmuster

Der Nachweis intakter mRNA von Interleukin-1-Beta gelingt für die Mehrheit der Proben bis sechs und maximal bis zwölf Tage nach der Blutentnahme. Diese Diskrepanz im Vergleich zu den anderen untersuchten Fragmenten, die eine Nachweisbarkeit von mehr als 123 Tagen vorwiesen, erlaubt es in unserer kleinen Stichprobe, das Alter einer Blutprobe einzugrenzen. Wenn sich kein Interleukin-1-Beta mehr nachweisen lässt, scheint die vorliegende Probe mindestens 13 Tage alt zu sein.

Auch von der in Abschnitt 5.2.3 kurz erläuterten Möglichkeit, die gedachten Schnittpunkte im Verlauf der Peakflächeninhalte zu betrachten, versprechen wir uns eine Eingrenzung des Probenalters. Wenn beispielsweise der Interleukin-1-Beta-Wert kleiner als der von GAPDH ist, gibt es die Möglichkeit, dass wir uns im zeitlichen Bereich vor dem ersten oder nach dem zweiten Schnittpunkt der Kurven der Peakflächeninhalte dieser beiden Fragmente befinden. Dazwischen liegt ein schmales Intervall möglicher Lagerungsdauern von minimal anderthalb Tagen bei Person 3 und maximal sechs Tagen bei Person 2. Nur in diesem schmalen Bereich fällt der GAPDH-Wert unter den von Interleukin-1-Beta. Eine Unterscheidung der beiden verbleibenden Bereiche, die durch einen höheren GAPDH-Wert im Vergleich zu Interleukin-1-Beta gekennzeichnet sind, könnte eventuell über die dritte mRNA Beta-Aktin erfolgen. Aufgrund der angenommenen Werteverfälschung der vorliegenden Daten wurde hiervon jedoch vorerst Abstand genommen. Es wäre in der Praxis auch möglich, Proben unklaren Alters bei Erhalt und zu einem späteren Zeitpunkt zu messen, um den Verlauf zu verfolgen. Die Betrachtung einzelner Fragmente erlaubt mitunter eine Zuordnung zu einzelnen zeitlichen Intervallen. Es finden sich jedoch überlappende Bereiche der Standardabweichung der Peakflächeninhalte, wenn die hier verwendeten 3-Tages-Intervalle betrachtet werden. Durch das Einbeziehen anderer mRNAs kann nur teilweise eine konkretere Zuordnung erfolgen.

6.2.2.5 Vergleich der Ergebnisse mit anderen Arbeiten

Verglichen mit den klassischen existierenden Methoden zur Todeszeitbestimmung kann festgehalten werden, dass sich die betrachteten mRNA-Abschnitte für einen Untersuchungszeitraum eignen, der das frühe postmortale Intervall weit überschreitet und damit prinzipiell die Möglichkeit eröffnet, für diesen Zeitraum aussagefähig zu sein. Während in diffizilen, jahrelangen Untersuchungen für die überwiegend genutzte Temperaturmethode klare Nomogramme mit vielfältigen Abhängigkeiten existieren, die zu einer sehr exakten Bestimmung führen, stellen die in dieser Untersuchung gebildeten Intervalle vorerst grobe Zeitgrenzen dar. Für eine praktische Anwendbarkeit müssen sowohl die Übertragbarkeit auf Leichenblut als auch eine möglichst engere Einschätzung des Todeszeitpunktes mit Abweichungen um wenige Stunden vom wahren Wert erreicht werden.

Abweichend von der Untersuchung von HEINRICH (Heinrich et al. 2007), wobei verschiedene Gewebe von sechs zu bekannten Zeitpunkten verstorbenen Menschen (maximales PMI 118 h) untersucht worden waren und kein Anhalt für einen Zusammenhang zwischen dem postmortalen Intervall und der Menge amplifizierbarer mRNA von GAPDH bestand, basierte die vorliegende Studie zwar auf der Arbeit mit definiert und gleichartig gealterten Bluten Lebender, die jedoch jeweils im Verlauf betrachtet wurden. Diese Verlaufsanalyse machte deutlich, dass es bei jeder Person zu einer Degradation intakter mRNA kommt, wobei sich unterschiedlich starke Schwankungen vor allem im Bereich des frühen postmortalen Intervalls zeigten. Die interindividuellen Unterschiede der mRNA-Menge zu Beginn können sowohl auf technische Schwierigkeiten als auch auf die von BUSTIN für GAPDH geäußerte Vermutung hinweisen, dass die vorhandenen mRNA-Mengen interindividuell doch stärker variieren als bisher angenommen (Bustin 2000).

In Übereinstimmung mit den Versuchen von BAUER (Bauer et al. 2003b) konnte gezeigt werden, dass Blut als Medium der RNA-Extraktion für Degradationsanalysen geeignet ist, wobei diese Studien auch mit venösem Blut, das außerhalb des menschlichen Körpers alterte, arbeiteten. BAUER verwendete hierbei EDTA-freie Monovetten und zwei unterschiedlich gelegene Beta-Aktin-Abschnitte. Er betont, dass Vergleiche zwischen EDTA-haltigem und EDTA-freiem Blut nicht zu Unterschieden bezüglich der RNA-Degradation geführt hätten. Prinzipiell könne EDTA einen inhibitorischen Einfluss auf menschliche RNAsen haben (Mujica et al. 1976). Wir konnten in Einklang mit BAUER ebenfalls bestätigen, dass es sich bei der Degradation der mRNA von Beta-Aktin sowie GAPDH um einen nicht-linearen Prozess handelt und dass aufgrund der Schwankungen der Daten bisher nur größere Intervalle mit ausreichend guter Abgrenzbarkeit voneinander betrachtbar sind.

Auch die Untersuchungen von BAHAR (Bahar et al. 2007) an definiert bei 4 °C bis zu 22 Tage postmortal degradierten tierischen Geweben zeigten eine lange mRNA-Stabilität. Es wurden hierbei etwas kürzere Abschnitte von Beta-Aktin (66 bp) und GAPDH (67 bp) analysiert.

Die Gruppe um INOUE (Inoue et al. 2002) verwendete ein Rattenmodell, bei dem nach festgelegten postmortalen Intervallen bis zu sieben Tagen unter Raumtemperatur GAPDH, Beta-Aktin und HPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase) als housekeeping Gene sowie Interleukin-1-Beta nach Induktion durch Injektion von Lipopolysacchariden mittels Real-Time-PCR an Hirn-, Herz-, Leber- und Lungengewebe amplifiziert und quantifiziert wurden. Interleukin wies ähnlich der vorliegenden Studie eine deutlich kürzere Nachweisbarkeitsdauer von drei Tagen postmortal bei schnellerer Degradation im Vergleich zu den übrigen Fragmenten auf. Die Autoren postulieren gleiche Degradationsraten der drei untersuchten housekeeping Gene bei Real-Time-Amplifikation. Die vorliegende Arbeit ergab in Form einer langsameren Degradation des untersuchten Beta-Aktin-Abschnittes im Vergleich zu GAPDH unterschiedliche Degradationsgeschwindigkeiten wie schon LUKIW (Lukiw et al. 1990) für verschiedene mRNA-Spezies beobachtet hatte. Allerdings lässt der Versuchsaufbau einen Vergleich mit dem Tiermodell von INOUE nur bedingt zu, da es sich um eine konventionelle PCR und Blut als Ausgangsmaterial handelte. Des Weiteren hängt die Degradation von der postmortalen Aktivität der Ribonukleasen ab, die auch pH-Wert abhängig ist. Äußere Einflüsse in Form exogener Ribonukleasen beispielsweise mikrobieller Herkunft (Bauer et al. 2003a) stellen weitere Einflussfaktoren dar, die in vivo wirksam sein könnten.

6.2.3 Ausblick

6.2.3.1 Multiplex-Ansatz

Gerade in forensischen Fällen liegen zu untersuchende Spuren häufig in limitierter Menge vor. Es ist deshalb günstig, Methoden zu entwickeln, die mit sehr geringen Ausgangsmengen an einzusetzender RNA auskommen. Beim Vorhaben mit verschiedenen mRNA-Spezies zu arbeiten, sollten die ausgewählten Fragmente und entsprechenden Primer von Anfang an auf potentielle Interaktionen geprüft werden, um sie später problemarm kombinieren zu können.

6.2.3.2 Zukünftige Untersuchungen

Aufgrund der kleinen Stichprobe wurden weiterführende Vergleiche der Probanden miteinander nur zurückhaltend durchgeführt und es ist bisher nicht klar, inwieweit interindividuelle Unterschiede vorhanden sind und mit formalen Angaben wie Geschlecht, Alter oder Gesundheitszustand im Zusammenhang stehen. Außerdem deutet sich aktuell an, dass

individuelle RNA-Mengenveränderungen durch agonale Umstände und durch die Todesart unterliegen können, so dass RNA-Expressions-Muster eventuell als supravitale Veränderungen gewertet werden könnten (Heinrich et al. 2007, Ikematsu et al. 2006). Weitere Untersuchungsbereiche beziehen die Lebensumstände in Form von Alkohol- und Drogenmissbrauch in die Betrachtung ein (Liu et al. 2004).

Es bedarf einer größeren Stichprobe, um statistisch aussagefähigere Mittelwerte und Standardabweichungen gewinnen und auf verschiedene Gruppen anwenden zu können. Für die langfristige Untersuchung eignen sich die ubiquitär vorhandenen mRNAs für Beta-Aktin und GAPDH. Die untersuchte induzierbare mRNA für Interleukin-1-Beta ist durch ihre rasche Degradation besonders geeignet, um Aussagen innerhalb der ersten zwei Wochen zu treffen.

Zusatzinformationen könnten sich auch ergeben, wenn andere mRNA-Abschnitte geprüft würden. Es wäre schön, eine mRNA zu finden, die ihre Nachweisgrenze zwischen ein und zwei Monaten hat. Alternativ ist es möglich, andere Teilsequenzen einer schon untersuchten mRNA zu amplifizieren, die jedoch näher am 5'-Ende gelegen sind, da die Degradation von dort ihren Anfang nimmt (Bauer et al. 2003a). Je näher das gewählte Fragment am 5'-Ende liegt, desto weniger lang ist es komplett nachweisbar.

Das noch ferne Ziel der Gesamtuntersuchung, wurde in Abbildung 23 anhand einer linearen Trendlinie mit Angabe des Bestimmtheitsmaßes beispielhaft veranschaulicht. Wie in dem eingefügten Kästchen zu sehen ist, wäre es wünschenswert, wenn mit Hilfe von experimentell gewonnenen Werten verallgemeinernde Kurven oder Formeln entstehen würden, die eine Vorhersage beziehungsweise Rückrechnung auf den Todeszeitpunkt ermöglichen.

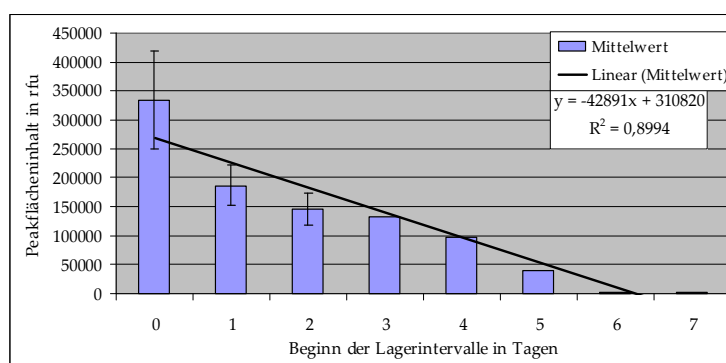


Abbildung 23: Mittelwerte der Peakflächeninhalte von Person 2 in Intervallen zu einem Tag mit linearer Trendlinie, Formel und Bestimmtheitsmaß.

Die Daten der Real-Time-PCR wurden zur Trendlinienberechnung über alle Probanden gegenüber der konventionellen PCR mit Endpunktmessung, nur indirekter Quantifizierung der amplifizierbaren mRNA-Mengen und den resultierenden, diskutierten Schwierigkeiten bevorzugt.

Verschiedene Trendlinien sind möglich, wobei die logarithmische Beschreibung der Degradation anhand der Analyse der Ct-Werte die besten Ergebnisse und das höchste Bestimmtheitsmaß lieferten. Abbildung 24 stellt diese Auswertung grafisch dar.

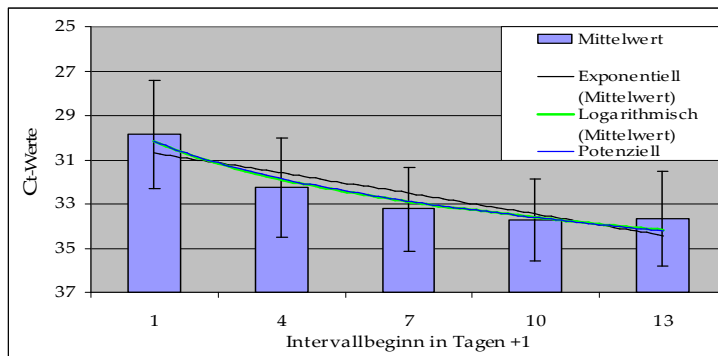


Abbildung 24: Darstellung der zu 3-Tages-Intervallen gruppierten Ct-Werte als Mittelwert aller Probanden mit Angabe der Standardabweichung. Je nach Art der verwendeten Trendlinie ergeben sich folgende Formeln mit Bestimmtheitsmaß: exponentiell ($y = 30,42e^{0,0095x}$; $R^2 = 0,7834$), logarithmisch ($y = 1,5807\ln(x) + 29,963$; $R^2 = 0,9814$), potenziell ($y = 29,974x^{0,0498}$; $R^2 = 0,9793$). Sowohl logarithmische als auch potenzielle Berechnungen sind mathematisch nur ohne Wert 0 möglich, weshalb die Zeitachse auf $t + 1$ skaliert wurde.

Mit dem Programm SPSS (Version 15.0, SPSS Incorporation) wurden anhand dieser Daten statistische Berechnungen in Form von Vorzeichentests durchgeführt, deren Ergebnisse in folgender Tabelle 2 dargestellt werden.

Tabelle 2: Ergebnis der Signifikanzanalyse

Intervalle	Intervall 1-2	Intervall 2-3	Intervall 3-4	Intervall 4-5
Lagerdauer	< 3 Tage vs. 3 - 5 Tage	3 bis 5 Tage vs. 6 bis 8 Tage	6 bis 8 Tage vs. 9 bis 11 Tage	9 bis 11 Tage vs. 12 bis 13 Tage
Exakte Signifikanz p (2-seitig)	0,031	0,031	0,031	0,375

Der Vorzeichentest prüft je zwei Intervalle auf signifikante Unterschiede des Ct-Wertes.

Anhand der Testergebnisse ist ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen 3-Tages-Intervallen bis zum vierten Intervall und damit bis zu einer Lagerdauer von neun bis elf Tagen anhand der sechs Probanden erkennbar. Die statistische Analyse der Verschiedenheit der Daten des Intervalls von neun bis elf mit dem von zwölf bis dreizehn Tagen erbrachte keine Signifikanz.

7 Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen auf, dass ein Zusammenhang zwischen der Lagerungszeit von Blut und den darin enthaltenen amplifizierbaren mRNA-Mengen besteht.

Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Degradation lassen sich hierbei zwischen den einzelnen untersuchten mRNA-Abschnitten erkennen und für eine grobe Einschätzung der Lagerdauer verwenden. Die GAPDH-mRNA lieferte im kompletten Untersuchungsbereich langfristig die besten Ergebnisse hinsichtlich der Auswertung der Fragmentlängenanalyse, wohingegen nach spätestens 13 Tagen keine Amplifikationsprodukte von Interleukin-1-Beta mehr detektierbar waren.

Auch mit der Methodik der Real-Time-PCR konnte eine eindeutige Degradation der Beta-Aktin-RNA gefunden und ein Zusammenhang zur Lagerdauer mit Hilfe des Ct-Wertes festgestellt werden. Insgesamt hat sich bei der bearbeiteten Fragestellung der Einsatz der Real-Time-PCR gegenüber der Fragmentlängenanalyse als technisch überzeugender erwiesen.

Im Rahmen der Arbeit zeigte sich, dass RNA bei Raumtemperatur gelagerter Blutproben weitaus stabiler und unkomplizierter zu verarbeiten ist als angenommen. Diese Informationen können zur Untersuchung der RNA-Qualität in Diagnostik und Forschung genutzt werden.

Für die Erarbeitung einer RNA-Degradationskurve des Blutes Toter kann die vorgestellte Studie methodisch als Vorlage dienen. Wenn eine spezifische Anpassung an die vielfältigen Abhängigkeiten von umgebenden Bedingungen gelingt, könnte es möglich sein, die untersuchten Systeme zur Ergänzung bisheriger Eingrenzungsmethoden des Todeszeitpunktes zu verwenden.

Trotzdem kann die morphologische und laborchemische Bestimmung des Todeszeitpunktes immer nur eine Schätzung und Annäherung sein. Je länger der Todeszeitpunkt zurück liegt und je mehr unbekannte umgebende Bedingungen vorliegen, desto größer werden die nennbaren Intervalle. Es ist deshalb natürlich nach wie vor unumgänglich, die kriminalistischen Nachforschungen über umgebende Umstände durchzuführen. Je näher die Eingrenzung gelingt, desto zielgerichteter und sinnvoller auswertbar können Zeugen und Tatverdächtige befragt werden. Die Fehlbestimmung des Todeszeitpunktes ist heikel, da es dadurch zu zunächst unwiderlegbaren Alibis und Ermittlungsverzögerungen kommen kann.

8 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Bär W, Brinkmann B, Budowle B, Carracedo A, Gill P, Holland M, Lincoln PJ, Mayr W, Morling N, Olaisen B, Schneider PM, Zully G, Wilson M. 2000. DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: Guidelines for mitochondrial DNA typing. *Int J Legal Med*, 113:193-196.
2. Bauer M, Gramlich I, Polzin S, Patzelt D. 2003a. Quantification of mRNA degradation as possible indicator of postmortem interval – a pilot study. *Legal medicine*, 5(4):220-227.
3. Bauer M, Polzin S, Patzelt D. 2003b. Quantification of RNA degradation by semi-quantitative duplex and competitive RT-PCR: a possible indicator of the age of bloodstains? *Forensic Sci Int*, 138(1-3):94-103.
4. Becker-André M. 1995. Evaluation of absolute mRNA levels by polymerase chain reaction-aided transcript titration assay (PAT*TY). In: Larrick JW, Siebert PD, Hrsg. *Reverse Transcriptase PCR*. London: Ellis Horwood, 121-149.
5. Benecke M. 2004. Besiedlung durch Gliedertiere. In: Madea B, Brinkmann B, Hrsg. *Handbuch der gerichtlichen Medizin 1*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 170-187.
6. Bensi G, Raugei G, Palla E, Carinci V, Tornese Buonamassa D, Melli M. 1987. Human interleukin-1 beta gene. *Gene*, 52(1):95-101.
7. Brink N, Szamel M, Young AR, Wittern KP, Bergemann J. 2000. Comparative quantification of IL-1beta, IL-10, IL-10r, TNFalpha and IL-7 mRNA levels in UV-irradiated human skin in vivo. *J Inflamm Res*, 49(6):290-6.
8. Bustin SA. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, 25:169-193.
9. Catts VS, Catts SV, Fernandez HR, Taylor JM, Coulson EJ, Lutze-Mann LH. 2005. A microarray study of post-mortem mRNA degradation in mouse brain tissue. *Mol Brain Res*, 138:164-177.
10. Chelly J, Concordet JP, Kaplan JC, Kahn A. 1988. Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissues. *Nature*, 333:858-860.
11. Chen YC, Cheng JD. 2002. The relationship between the postmortem degradation of marrow DNA in bone and late postmortem interval estimation. *Fa Yi Xue Za Zhi*, 18(3):144-145.
12. Cina SJ. 1994. Flow cytometric evaluation of DNA Degradation: a predictor of postmortem interval? *Am J Forensic Med Pathol*, 15(4):300-302.

13. Cummings TJ, Strum JC, Yoon LW, Szymanski MH, Hulette CM. 2001. Recovery and expression of messenger RNA from postmortem human brain tissue. *Mod Pathol*, 14:1157-1161.
14. Di Nunno N. 1999. Determination of the time of death in a Homicide-Suicide Case using Flow Cytometry. *Am J Forensic Med Pathol*, 20(3):228-231.
15. Di Nunno N, Costantinides F, Cina SJ, Rizzardi C, Di Nunno D, Melato M. 2002. What is the best sample for determining the early postmortem period by on-the-spot Flow Cytometry Analysis? *Am J Forensic Med Pathol*, 23(2):173-180.
16. Dotzauer G. 1958. Idiomuskulärer Wulst und postmortale Blutung. *Dtsch Z ges gerichtl Med*, 46:761-771.
17. Eldadah ZA, Asher DM. 1995. The application of RT-PCR to other infectious diseases. In: Larrick JW, Siebert PD, Hrsg. *Reverse Transcriptase PCR*. London: Ellis Horwood, 319-346.
18. El-Ghrably IA, Dua HS, Orr GM, Fischer D, Tighe PJ. 2001. Intravitreal invading cells contribute to vitreal cytokine milieu in proliferative vitreoretinopathy. *Br J Ophthalmol*, 85(4):461-70.
19. Ercolani L, Florence B, Denaro M, Alexander M. 1988. Isolation and complete sequence of a functional human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. *J Biol Chem*, 263(30):15335-15341.
20. Goblet C, Prost E, Whalen RG. 1989. One-step amplification of transcripts in total RNA using the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research*, 17(5):2144.
21. Goblet C, Prost E, Bockhold KJ, Wahlen RG. 1992. One-tube versus two-step amplification of RNA transcripts using polymerase chain reaction. *Methods Enzymol*, 216:160-168.
22. Hagen-Mann K, Mann W. 1994. Quantitative PCR. In: Wink M, Wehrle H, Hrsg. *PCR im medizinischen und biologischen Labor – Handbuch für den Praktiker*. Darmstadt: GIT Verlag GmbH, 84-96.
23. Hara N, Kasahara T, Kawasaki T, Bilim V, Obara K, Takahashi K, Tomita Y. 2002. Reverse transcription-polymerase chain reaction detection of prostate-specific antigen, prostate-specific membrane antigen, and prostate stem cell antigen in one milliliter of peripheral blood: value for the staging of prostate cancer. *Clin Cancer Research*, 8(6):1794-1799.

24. Hayward AL, Oefner PJ, Kainer DB, Hinojos CA, Doris PA. 1999. Kinetics of competitive reverse transcriptase-PCR. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, Hrsg. PCR Applications. San Diego: Academic Press, 231-261.
25. He M, Liu E, Conway K. 1995. Semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for the detection of low abundance transcripts in human cells. In: Larrick JW, Siebert PD, Hrsg. Reverse Transcriptase PCR. London: Ellis Horwood, 289-299.
26. Heinrich M, Matt K, Lutz-Bonengel S, Schmidt U. 2007. Successful RNA extraction from various human postmortem tissues. *Int J Legal Med*, 121(2):136-142.
27. Henry JB and Smith FA. 1980. Estimation of the postmortem interval by chemical means. *Amer J For Med Path*, 1(4):341-347.
28. Henssge C, Madea B., Hrsg. 1988. Methoden der Todeszeitbestimmung an Leichen. Lübeck: Verlag Max Schmidt-Römhild.
29. Henssge C, Althaus L, Bolt J, Freisleder A, Haffner HT, Henssge CA, Hoppe B and SCHNEIDER V. 2000. Experiences with a compound method for estimating the time since death. I. Rectal temperature nomogram for time since death. *Int J Legal Med*, 113:303-319.
30. Henssge C, Madea B, Krompecher T, Nokes L, Knight B, Hrsg. 2002. The Estimation of the time since death in the early postmortem period. 2nd Edition. London: Hodder Arnold.
31. Higuchi R, Watson R. 1999. Kinetic PCR Analysis using a ccd camera and without using oligonucleotide probes. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, Hrsg. PCR Applications. San Diego: Academic Press, 263-284.
32. Ikematsu K, Tsuda R, Nakasono I. 2006. Gene response of mouse skin to pressure injury in the neck region. *Leg Med (Tokyo)*, 8:128-131.
33. Inoue H, Kimura A, Tuji T. 2002. Degradation profile of mRNA in a dead rat body: basic semi-quantification study. *Forensic Science International*, 130:127-132.
34. James RA, Hoadley PA, Sampson BG. 1997. Determination of Postmortem Interval by Sampling Vitreous Humour. *Am J For Med Path*, 18(2):158-162.
35. Johnson LA, Ferris JA. 2002. Analysis of post-mortem DNA degradation by single-cell gel electrophoresis. *Forensic Sci Int*, 126(1):43-47.
36. Johnston NL, Cervenak J, Shore AD, Torrey EF, Yolken RH, Cerevna J. 1997. Multivariate analysis of RNA levels from postmortem human brains as measured by three different methods of RT-PCR. *J Neurosci Methods*, 77:83-92.

37. Kang JJ, Holland MJ. 1999. Cellular transcriptome analysis using a kinetic PCR assay. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, Hrsg. PCR Applications. San Diego: Academic Press, 429-444.
38. Kawasaki ES, Clark SS, Coyne MY, Smith SD, Champlin E, Witte ON, McCormick FP. 1988. Diagnosis of chronic myeloid and acute lymphocytic leukemias by detection of leukaemia-specific mRNA sequences amplified in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85:5698-5702.
39. Kelley JM, Quackenbush J. 1999. Sequencing PCR Products. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, Hrsg. PCR Applications. San Diego: Academic Press, 127-139.
40. Kinoshita T, Shimotohno K. 1995. Quantitative RT-PCR based on multiplex amplification curves. In: Larrick JW, Siebert PD, Hrsg. Reverse Transcriptase PCR. London: Ellis Horwood, 181-189.
41. Klein A, Klein S. 1978. Die Todeszeitbestimmung am menschlichen Auge [Dissertation]. Dresden: Medizinische Akademie.
42. Knippers R. 2006. Molekulare Genetik. Neunte Aufl. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 321.
43. Larrick JW, Siebert PD, Hrsg. 1995. Reverse Transcriptase PCR. London: Ellis Horwood, 2-20.
44. Lin LQ, Liu L, Deng WN, Zhang L, Liu YL, Liu Y. 2000. An experimental study on the relationship between the estimation of early postmortem interval and DNA content of liver cells in rats by image analysis. *Fa Yi Xue Za Zhi*, 6(2):68-9, 127.
45. Liu L, Peng DB, Liu Y. 2001. A study on the relationship between postmortem interval and the changes of DNA content in kidney cellule of rat. *Fa Yi Xue Za Zhi*, 17(2):65-68.
46. Liu J, Lewohl JM, Dodd PR, Randall PK, Harris RA, Mayfield RD. 2004. Gene expression profiling of individual cases reveals consistent transcriptional changes in alcoholic human brain. *J Neurochem*, 90:1050-1058.
47. Lukiw WJ, Wong L, McLachlan DR. 1990. Cytoskeletal messenger RNA stability in human neocortex: studies in normal aging an in Alzheimer's disease. *Int J Neurosci*, 55(2-4):81-88.
48. Macfarlane DE, Dahle CE. 1993. Isolating RNA from whole blood – the dawn of RNA-based diagnosis? *Nature*, 362:186-189.
49. Madea B, Käferstein H, Hermann N, Sticht G. 1994. Hypoxanthine in vitreous humor and cerebrospinal fluid – a marker of postmortem interval and prolonged (vital) hypoxia? Remarks also on hypoxanthine in SIDS. *For Sci Int*, 65:19-31.

50. Mall EG. 2000. Temperaturgestützte Bestimmung der Todeszeit mit Hilfe der Methode der Finiten Elemente [Habitationsarbeit]. München: Ludwig-Maximilians-Universität.
51. Mallach HJ. 1964. Zur Frage der Todeszeitbestimmung. *Berl Med*, 18:577-582.
52. Mallach HJ und Laudahn G. 1964. Vergleichende Untersuchungen mit enzymatischen Methoden an Vital- und Leichenbluten im Hinblick auf die Todeszeit. *Klin Wschr*, 42:693-699.
53. Marchuk L, Sciore P, Reno C, Frank CB, Hart DA. 1998. Postmortem stability of total RNA isolated from rabbit ligament, tendon and cartilage. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1379(2):171-177.
54. Marshall TK, Hoare FE. 1962. Estimating the time of death - The rectal cooling after death and its mathematical expression. *J For Sci*, 7(1):56-81.
55. Mujica A, Romero G, Hernandez-Montes H. 1976. Human semen ribonuclease. Location, properties and inhibition by sodium dodecyl sulfate, zinc sulfate and EDTA. *Int J Fertil*, 2:109-113.
56. Munoz Barús JI, Suárez-Penaranda JM, Otero XL, Rodriguezcalvo MS, Costas E, Miguéns X, Concheiro L. 2002. Improved estimation of postmortem interval based on differential behaviour of vitreous potassium and hypoxanthine in death by hanging. *For Sci Int*, 125:67-74.
57. Murphy LD, Herzog CE, Rudick JB, Fojo AT, Bates SE. 1990. Use of the polymerase chain reaction in the quantification of *mdr-1* gene expression. *Biochemistry*, 29(45):10351-10356.
58. Nakajima-Iijima S, Hamada H, Reddy P, Kakunaga T. 1985. Molecular structure of the human cytoplasmic beta-actin gene: interspecies homology of sequences in the introns. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82(18):6133-6137.
59. Nikitina TV, Nazarova NY, Tishchenko LI, Tuohimaa P, Sedova VM. 2003. Use of the real-time RT-PCR method for investigation of small stable RNA expression level in human epidermoid carcinoma cells A431. *Tsitologiya*, 45(4):392-402.
60. Oshima T, Sato Y. 1998. Time-dependent expression of interleukin-10 (IL-10) mRNA during the early phase of skin wound healing as a possible indicator of wound vitality. *Int J Legal Med*, 111:251-255.
61. Pannetier C, Delassus S, Darche S, Saucier C, Kourilsky P. 1993. Quantitative titration of nucleic acids by enzymatic amplification reactions run to saturation. *Nucleic Acids Res*, 21:577-583.
62. Payne PW, Johnson LA, Haskins D, Baccino E, Ferris JAJ. 1999. Estimation of

- time since death by image cytometric analysis of cell nuclei. In: Proceedings of the 5th International Conference on Clinical Forensic Medicine of the World Police Medical Officers, Vancouver, Canada. J Clin Forensic Med 6(3):197.
63. Perry III WL, Bass WM, Riggsby WS, Sirotkin K. 1988. The autodegradation of deoxyribonucleic acid (DNA) in human rib bone and its relationship to the time interval since death. J Forensic Sci, 33:144-153.
 64. Phang TW, Shi CY, Chia JN, Ong CN. 1994. Amplification of cDNA via RT-PCR using RNA extracted from postmortem tissues. J Forensic Sci, 39:1275-1279.
 65. Porcher C, Malinge MC, Picat C, Grandchamp B. 1992. A simplified method for determination of specific DNA or RNA copy number using quantitative PCR and an automated DNA Sequencer. BioTechniques, 13(1):106-113.
 66. Prokop O, Reimann W, Geserick G, Hrsg. 1990. Vade mecum Gerichtsmedizin. Fünfte, überarbeitete Aufl. Berlin: Verl Gesundheit GmbH, 28.
 67. Promega Corporation 2003. Technical manual: SV Total RNA Isolation System. Promega, TM048:20.
 68. Promega Corporation 2006. Technical manual: Plexor™ One-Step qRT-PCR System. Promega, TM263:3.
 69. Rappolee DA, Wang A, Mark D, Werb Z. 1989. Novel method for studying mRNA phenotypes in single or small numbers of cells. J Cell Biochem, 39(1):1-11.
 70. Reddi KK, Holland JK. 1976. Elevated serum ribonuclease in patients with pancreatic cancer. Proc Natl Acad Sci USA, 73(7):2308-2310.
 71. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. Anal Biochem, 245:154-160.
 72. Sardelli AD. 1993. Plateau effect - Understanding PCR limitations. Amplification, 9:1-5.
 73. Schleyer F. 1967. Neuere Erkenntnisse über agonale und frühpostmortale chemische Vorgänge in den Körperflüssigkeiten. Dtsch Z ges gerichtl Med, 59:48-54.
 74. Schramm M, Falkai P, Tepest R, Schneider-Axmann T, Przkora R, Waha A, Pietsch T, Bonte W, Bayer TA. 1999. Stability of RNA transcripts in post-mortem psychiatric brains. J Neural Transm, 106:329-335.
 75. Sherrill CB et al. 2004. Plexor™ Real-Time Quantitative PCR Systems. J Am Chem Soc, 126:4550-4556.
 76. Shuldiner AR, Huang Ze. 1995. Reducing False Positives with RNA Template specific PCR (RS-PCR). In: Larrick JW, Siebert PD, Hrsg. Reverse Transcriptase PCR. London:

Ellis Horwood, 50-60.

77. Surzycki S, Hrsg. 2000. Basic Techniques in Molecular Biology. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 119-144, 411.
78. Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E. 1999. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol*, 75(2-3):291-295.
79. Trotter SA, Brill II LB, Bennett Jr. JP. 2002. Stability of gene expression in postmortem brain revealed by cDNA gene array analysis. *Brain Res*, 942:120-123.
80. Vass AA, Barshick SA, Sega G, Caton J, Skeen JT, Love JC, Synstelién JA. 2002. Decomposition chemistry of human remains: a new methodology for determining the postmortem interval. *J Forensic Sci*, 47(3):542-553.
81. Westermeier R, Hrsg. 1993. Electrophoresis in practice. Weinheim: VCH, 133-152.
82. Williams PM, Tucker AL. 1999. Real-time quantitative PCR: Uses in discovery research. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, Hrsg. PCR Applications. San Diego: Academic Press, 365-375.
83. Wilson MR, Polanskey D, Butler J, DiZinno JA, Replogle J, Budowle B. 1995. Extraction, PCR amplification and sequencing of mitochondrial DNA from human hair shafts. *BioTechniques*, 18:662-668.
84. Wu DY, Ugozzoli L, Pal BK, Qian J, Wallace RB. 1991. Laboratory methods: the effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA and Cell Biology*, 10:233-238.
85. Yasojima K, McGeer EG, McGeer PL. 2001. High stability of mRNAs postmortem and protocols for their assessment by RT-PCR. *Brain Research Protocols*, 8(3):212-218.
86. Zhao D, Zhu BL, Ishikawa T, Quan L, Li DR, Maeda H. 2005. Real-time RT-PCR quantitative assays and postmortem degradation profiles of erythropoietin, vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor 1 alpha mRNA transcripts in forensic autopsy materials. *Leg Med*, 8:132-136.

9 Anhang

9.1 Daten

Tabelle 3: Übersicht der erhobenen Peakflächeneinheiten für das gewählte Interleukin-1-Beta-Fragment

Proband	Person 1	Person 2	Person 3	Person 4	Person 5	Person 6
Lagerdauer						
0	291570	434670	341760	384880	537825	239860
1 h	527140	379600	213790	187360	395730	434740
3 h	476968	226360	358820	337520	447810	371960
6 h	382210	271870	254370	263180	346360	290595
12 h	102540	358080	328290	261130	213470	43970
24 h	423240	162440	215990	219620	184910	122630
36 h	423000	211206	146610	180800	164620	74330
48 h	482750	165879	226168	214350	229826	87422
60 h	416000	127093	149974	169714	126548	47620
3 d	222190	133574	57883	92909	77860	32921
4 d	107720	97580	PCR negativ	40305	121359	37180
5 d	23589	39660	2080	9175	31826	PCR negativ
6 d	2491	1627	1978	6164	690	PCR negativ
7 d	PCR negativ	2637	410	PCR negativ	PCR negativ	887
8 d	PCR negativ	PCR negativ	1118	555	1158	PCR negativ
9 d	763	PCR negativ	PCR negativ	PCR negativ	PCR negativ	747
10 d	818	PCR negativ	2660	1274	1167	966
11 d	257	PCR negativ	PCR negativ	PCR negativ	PCR negativ	PCR negativ
12 d	PCR negativ	Probe verbraucht	PCR negativ	2397	PCR negativ	2784
13 d	PCR negativ		PCR negativ	PCR negativ	PCR negativ	PCR negativ
35 d	PCR negativ		PCR negativ	PCR negativ	PCR negativ	PCR negativ
67 d	PCR negativ		PCR negativ	PCR negativ	PCR negativ	PCR negativ
96 d	PCR negativ		PCR negativ	PCR negativ	PCR negativ	PCR negativ
123 d	PCR negativ		PCR negativ	PCR negativ	PCR negativ	PCR negativ

Tabelle 4: Peakflächeninhalte aller Personen für das untersuchte GAPDH-Fragment

Proband	Person 1	Person 2	Person 3	Person 4	Person 5	Person 6
Lagerdauer						
0	852330	364540	230940	745800	182920	174770
1 h	396370	546990	624855	145240	98620	205510
3 h	301170	91340	590685	287380	406570	265380
6 h	567330	484470	293080	365690	282050	98920
12 h	205250	PCR negativ	382180	474220	197300	107760
24 h	566060	481850	304530	394200	183510	203940
36 h	512000	408240	370360	174040	159760	199690
48 h	517590	183330	143670	228020	192030	99680
60 h	225140	142740	68450	124830	108990	25040
3 d	68890	78440	26350	32110	7670	19700
4 d	60070	33290	10480	11680	29410	46470
5 d	29600	31460	15010	19000	42560	20660
6 d	9562	21602	13156	13454	17218	11890
7 d	12748	12726	11728	11995	11452	9200
8 d	19224	10716	7051	9872	8327	21574
9 d	6907	8676	12040	6384	15525	6690
10 d	6140	6148	4297	9702	3895	3439
11 d	6340	6889	9479	5098	5013	10895
12 d	1192	Probe verbraucht	20073	11140	9307	4281
13 d	7171		4158	2813	11582	1984
35 d	2447		1369	4278	5829	2895
67 d	38917		23624	37766	61868	37288
96 d	1443		3470	1447	2193	2340
123 d	1751		5906	2296	4318	2688

Tabelle 5: Darstellung der zugrunde liegenden Messwerte aller Personen über alle Zeitpunkte des Fragmentes Beta-Aktin

Proband	Person 1	Person 2	Person 3	Person 4	Person 5	Person 6
Lagerdauer						
0	160505	213400	110720	398770	83860	99690
1 h	70160	86590	182925	177495	56040	74630
3 h	139400	197260	160100	86540	69155	72135
6 h	98875	119375	77380	169945	160825	106005
12 h	131080	258590	95345	152570	114620	284000
24 h	146830	213025	92265	60675	127395	83300
36 h	134155	313920	221245	210490	117660	206535
48 h	317160	291220	133400	137615	121920	160785
60 h	238360	192860	192010	57696	173740	108550
3 d	209475	209188	102720	74240	120970	76667
4 d	223525	121980	109100	114170	101495	105584
5 d	85560	191090	84985	49352	93795	42398
6 d	206890	168023	26827	43317	85040	94423
7 d	99005	152570	20605	27618	22521	15287
8 d	7861	24133	17743	16729	8728	9790
9 d	37240	30901	13185	20490	15228	17226
10 d	52864	16589	11828	12323	11717	8713
11 d	1955	14060	6110	10206	25379	1648
12 d	9129	Probe verbraucht	2700	13797	12485	11495
13 d	10929		3798	22591	21698	3393
35 d	1930		1394	11020	19675	8638
67 d	1687		1544	5307	20303	3403
96 d	2362		1957	893	1911	214
123 d	1033		1795	3663	4812	946

Tabelle 6: Übersicht über die Ct-Werte der verschiedenen Lagerdauern der einzelnen Personen mit je zwei verwendeten RNA-Extrakten.

Proband	Person 1	Person 1 (E2)	Person 2	Person 2 (E2)	Person 3	Person 3 (E2)
Lagerdauer						
0	23,29	26,42	26,46	26,33	31,9	31,03
1 h	24,28	27,36	28,29	29,03	31,55	31,75
3 h	27,07	29,75	30,3	29,45	31,12	31,94
6 h	25,7	26,5	25,39	31,47	32,33	30,94
12 h	29,12	24,35	29,51	30,82	32,18	33,38
24 h	25,73	27,2	31,46	28,86	32,88	31,73
36 h	25,35	26,73	28,96	29,67	31,84	30,38
48 h	25,63	26,34	28,82	28,43	32,15	32,87
60 h	27,51	28,21	30,22	30,27	32,94	32,01
3 d	29,31	29,48	30,25	30,7	34,35	33,42
4 d	29,72	30,3	32,07	31,63	35,09	35,16
5 d	30,16	31,27	29,75	32,14	34,97	35,39
6 d	31,49	31,4	33,23	32,5	35,14	35,13
7 d	31,38	30,16	31,93	32,79	35,01	35,33
8 d	32,04	31,94	32,75	32,4	35,13	34,95
9 d	31,97	31,74	33,4	33,32	35,43	35,39
10 d	31,53	31,59	34,09	Probe verbraucht	35,52	35,56
11 d	32,42	32,34	33,59		35,76	36,05
12 d	31,17	32,32	Probe verbraucht		35,65	35,51
13 d	30,99	32,59			35,46	35,47
35 d	30,23	32,6			35,6	35,65
67 d	32,51	29,48			35,86	32,91
96 d	32,63	32,61			35,11	34,97
123 d	33,29	33,01			35,3	34,7
178 d	32,39	32,96			35,09	35,36

Proband	Person 4	Person 4 (E2)	Person 5	Person 5 (E2)	Person 6	Person 6 (E2)
Lagerdauer						
0	31,09	32,87	26,89	26,1	28,85	27,28
1 h	33,83	32,95	28,99	29,01	29,16	28,31
3 h	33,51	33,64	28,11	29,71	28,91	29,64
6 h	33,58	33,69	28,75	29,87	29,93	30,12
12 h	32,8	34,65	29,39	27,38	29,96	29,81
24 h	33,08	33,43	29,15	28,29	29,46	29,4
36 h	33,93	32,33	29,23	27,56	28,92	29,92
48 h	33,33	33,63	28,75	28,65	29,38	29,68
60 h	34,27	35,42	29,51	30,34	30,7	31,59
3 d	35	35,02	30,52	30,74	31,03	31,12
4 d	35,33	35,75	29,51	30,93	30,62	31,65
5 d	35,85	36,65	30,55	30,74	32,76	32,5
6 d	35,7	36	32,25	31,07	31,98	33,31
7 d	36,1	36,6	31,26	31,42	32,36	32,59
8 d	36,39	36,68	30,97	31,67	32,58	32,93
9 d	36,67	36,96	31,65	31,62	33,01	33,44
10 d	36,11	36,42	32,2	31,56	33,01	32,44
11 d	36,24	36,84	31,33	31,6	33,32	32,98
12 d	36,24	36,29	31,37	31,72	32,77	32,78
13 d	37,03	36,73	31,58	31,93	33,13	32,91
35 d	36,57	36,53	31,34	31,97	33,39	33,49
67 d	36,26	35,53	31,94	30,59	32,37	30,76
96 d	37,1	37,63	31,67	32,07	33,28	30,59
123 d	36,59	36,62	32,79	31,64	33,74	33,69
178 d	37,2	37,28	31,93	32,68	33,25	33,86

9.2 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist, dass ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind.

Ich erkläre weiterhin, dass mich bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts Herr Dr. Matthias Michael unterstützt hat und dass die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde. Dadurch haben Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Ich habe die Dissertation nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung und auch nicht die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule eingereicht.

Teile der Dissertation wurden anlässlich der 92. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie im Mai 2008 in Berlin als Poster präsentiert und in folgender Weise publiziert:

Wiegert S, Mall G, Petersen I, Michael M. 2008. mRNA analysis of aged blood specimens. Pathologe, 29 (Suppl.1):58 (Fr-148).

Jena, den 26.06.2008